

**MEZŐGAZDASÁGI ÉS KLINIKAI SZEMPONTBÓL JELENTŐS
AFLATOXIN-TERMELŐ *ASPERGILLUS* IZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE ÉS
GENETIKAI VARIABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

BARANYI NIKOLETT

TÉMAVEZETŐ:

**DR. VARGA JÁNOS
EGYETEMI TANÁR**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség	8
3.1.1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség <i>Flavi</i> szekciója	9
3.2. <i>Aspergillus</i> fajok szaporodása	13
3.3. Az <i>Aspergillus</i> fajok által termelt mikotoxinok	15
3.3.1. Aflatoxinok	16
3.3.1.1. Felfedezés és szerkezet	16
3.3.1.2. Aflatoxin-termelő fajok	18
3.3.1.3. Aflatoxinok előfordulása	18
3.3.1.4. Aflatoxinok biológiai hatása	20
3.3.1.5. Aflatoxin-bioszintézis	20
3.3.2. Sterigmatocisztin	23
3.3.3. Egyéb fontos mikotoxinok	24
3.4. <i>Aspergillus flavus</i> , mint humánpatogén	25
3.4.1. Légzőszervrendszert érintő főbb megbetegedések	26
3.4.2. Keratitisz	27
3.4.3. Egyéb megbetegedések	27
3.5. A klinikumban alkalmazott fontosabb gombaellenes szerek	28
3.5.1. Polién-típusú gombaellenes szerek	29
3.5.2. Azol-típusú gombaellenes szerek	30
3.5.3. Echinokandin-típusú gombaellenes szerek	31
4. CÉLKITŰZÉSEK	33
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
5.1. Alkalmazott <i>Aspergillus</i> izolátumok	34
5.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	34
5.3. Alkalmazott pufferek és reagensek	35
5.4. Tenyésztési körülmények	36
5.5. Vizsgálati módszerek	36
5.5.1. Genomi DNS tisztítása	36
5.5.2. DNS gélelektroforézis	37

5.5.3. DNS fragmentumok izolálása agaróz gélből	37
5.5.4. PCR technikák	37
5.5.5. DNS fragmentumok szekvenálása és a szekvenciák elemzése	41
5.5.6. Aflatoxin-termelő képesség vizsgálata	41
5.5.7. Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata	42
5.5.8. Genetikai variabilitás vizsgálata	42
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	43
6.1. Potenciális aflatoxin-termelő <i>Aspergillus</i> fajok izolálása és szekvencia alapú azonosítása	43
6.2. Klinikai izolátumok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata	48
6.3. Az izolátumok aflatoxin-termelő képességének vizsgálata	51
6.3.1. A vizsgált izolátumok aflatoxin-termelő képessége	52
6.3.2. Aflatoxin-termelés vizsgálata eltérő tenyésztési körülmények mellett	54
6.4. Genetikai variabilitás vizsgálata UP-PCR és mikroszatellit-analízissel	61
6.5. Párosodási típus gének vizsgálata	70
7. ÖSSZEFOGLALÁS	77
8. SUMMARY	81
9. IRODALOMJEGYZÉK	84
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	105
11. MELLÉKLETEK	107

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABPA	<u>A</u> llergic <u>B</u> ronchopulmonary <u>A</u> spergillosis (Allergiás bronchopulmonáris aszpergillózis)
AFLP	<u>A</u> mplified <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism (Felsokszorozott fragmentum hossz polimorfizmus)
AFS	<u>A</u> llergic <u>F</u> ungal <u>S</u> inusitis (Allergiás gombás szinusztisz)
BHI	<u>B</u> rain <u>H</u> eart <u>I</u> nfusion medium (Agy-szív keveréket tartalmazó tápközeg)
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
CLSI	<u>C</u> linical <u>L</u> aboratory <u>S</u> tandard <u>I</u> nstitute
CCPA	<u>C</u> hronic <u>C</u> avitary <u>P</u> ulmonary <u>A</u> spergillosis (Krónikus tüdő aszpergillózis)
CFU	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit (Telepképző egység)
CoA	<u>C</u> oenzyme <u>A</u> (Koenzim A)
CYA	<u>C</u> zapek <u>Y</u> east <u>A</u> utolizate
DRBC	Dichloran, Rose Bengal, Chloramphenicol
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography (Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
IARC	<u>I</u> nternational <u>A</u> gency for <u>R</u> esearch on <u>C</u> ancer (Nemzetközi Rákkutató Ügynökség)
MAT	<u>M</u> ating-type (Párosodási típus)
MEA	Malt Extract Agar
MIC	<u>M</u> inimum <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration (Minimális gátlási koncentráció)
MLEE	<u>M</u> ultilocus <u>E</u> nzyme <u>E</u> lectrophoresis (Multilókusz enzim elektroforézis)
MLP	<u>M</u> icrosatellite <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism (Mikroszatellit hossz polimorfizmus)
OTA	<u>O</u> chratoxin <u>A</u>
OTB	<u>O</u> chratoxin <u>B</u>
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polimeráz láncreakció)
PDA	<u>P</u> otato <u>D</u> extrose <u>A</u> gar
PEG	<u>P</u> olietilén-glikol
RAPD	<u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA (Random felsokszorozódó polimorf DNS)

RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism (Restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus)
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism (Egy nukleotid polimorfizmus)
STR	<u>S</u> hort <u>T</u> andem <u>R</u> epeat (Rövid ismétlődő szekvencia)
SZMC	<u>S</u> zeged <u>M</u> icrobiological <u>C</u> ollection (Szeged Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény)
TLC	<u>T</u> hin <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography (Vékonyréteg kromatográfia)
UP-PCR	<u>U</u> niversally <u>P</u> rimed <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Univerzálisan bekötődő polimeráz láncreakció)
VCG	<u>V</u> egetative <u>C</u> ompatibility <u>G</u> roup (Vegetatív kompatibilitási csoport)
YES	<u>Y</u> east <u>E</u> xtract – <u>S</u> ucrose medium
YPD	<u>Y</u> east extract – <u>P</u> epton – <u>D</u> extrose medium

2. BEVEZETÉS

Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának tagjai mind mezőgazdasági, mind pedig klinikai szempontból igen fontosnak tekinthetők. Napjainkban az *Aspergillus* fajok egyre gyakrabban okoznak gombafertőzéseket (mikózisokat) legyengült immunrendszerű betegekben. Ennek hátterében a modern immunszuppresszáns terápiák elterjedése, illetve a szervátültetések növekvő száma állhat (Cohen és mtsi. 1993). Az *Aspergillus fumigatus* után az *Aspergillus flavus* az invazív aszpergillózis második leggyakoribb előidézője, illetve a felületi fertőzések leggyakoribb okozója (Hedayati és mtsi. 2007). A fertőzés legtöbbször a légzőszervrendszerben jelentkezik, de gyakran okoz szemfertőzést (keratitisz) és fülfertőzést (otitisz) is. Az *Aspergillus* fajok a gombák által okozott keratitisz egyik leggyakoribb előidézői szubtrópusi, illetve trópusi területeken. A fertőzés egyik leggyakoribb forrása a növényi részek által okozott sérülés a mezőgazdasági munka során. Az *Aspergillus* fajok közül főként az *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* és *A. niger* jelentős mint opportunistá humán patogén (Latgé 1999). Az *Aspergillus* fertőzések megfelelő kezeléséhez nagyon fontos a klinikai *Aspergillus* izolátumok fajszerű meghatározása, ugyanis a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre.

Az *A. flavus* jelentős mezőgazdasági kártevő, súlyos hozamvesztéseket okoz világszerte, emellett az egyik leggyakrabban előforduló aflatoxin-termelő faj. Az aflatoxinok a legjelentősebb mikotoxinok közé tartoznak, melyek termelésére az *Aspergillus* nemzetségen belül közel 20 faj képes. Az aflatoxinok a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC 2012) által meghatározott besorolás szerint az 1. csoportba, azaz az emberekre bizonyítottan rákkeltő anyagok csoportjába tartoznak. A számos ismert aflatoxin forma (aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁) közül az aflatoxin B₁ rendelkezik a legerősebb rákkeltő hatással. Az aflatoxin-termelő gombák előfordulásának kedvező környezeti feltételek a nedvesség és a magas hőmérséklet, ezért az *A. flavus* elsősorban a melegebb, trópusi és szubtrópusi területeken képes aflatoxinokat előállítani (Varga és mtsi. 2009). A közép-európai országokban, melyek a mérsékelt éghajlati övben helyezkednek el, a mezőgazdasági termékek aflatoxin-szennyezettsége eddig nem jelentett komoly egészségügyi kockázatot. A globális felmelegedés által előidézett megváltozott klimatikus viszonyok azonban jelentős változásokat okoztak az utóbbi években. Számos tanulmány foglalkozott az éghajlatváltozás hatására megjelenő aflatoxin-termelő gombákkal és az aflatoxinok élelmiszerekben történő előfordulásával (Cotty és Jaime-Garcia 2007, Miraglia és mtsi. 2009, Paterson és Lima 2010, Tirado és mtsi. 2010, Baranyi és mtsi. 2015b). A legújabb

vizsgálatok alátámasztották, hogy az aflatoxin-termelő gombák megjelenése egyben maga után vonta a mezőgazdasági termékek aflatoxin-szennyezettségének növekedését is.

Mindezek alapján szükségesnek láttuk, hogy vizsgálatainkat minél szélesebb izolálási körből származó *Aspergillus* izolátummal végezzük el, melyek alapján nyomon követhetjük az aflatoxin-termelő gombák közép-európai elterjedését. Munkánk során ezért számos klinikai és mezőgazdasági forrásból származó *Aspergillus* izolátum vizsgálatát tűztük ki célul. Elvégeztük az izolátumok fajszerű azonosítását és meghatároztuk az aflatoxin-termelő képességüket. Vizsgáltuk továbbá a különböző forrásból származó izolátumok genetikai variabilitását UP-PCR és mikroszatellit-analízis alkalmazásával, ezenkívül megállapítottuk a klinikai izolátumok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységét.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az *Aspergillus* nemzetség

Az *Aspergillus* nemzetség rendszertanilag az aszkuszos fonalasgombák Eurotiales rendjének Aspergillaceae családjába sorolható. A nemzetség elnevezése a latin *aspergillum* (szenteltvízhintő) szóból ered, ugyanis 1729-ben a nemzetséget leíró Pietro Antonio Micheli-t a vizsgált gombák konídiumtartói erre az eszközre emlékeztették (Micheli 1729). A nemzetségbe ma közel 350 faj tartozik. Morfológiai szempontból az ide tartozó fajok többségének fő jellemzője a konídiumtartók megléte.

A nemzetségbe tartozó fajok számos az élelmiszeripar számára fontos enzim (pl. amilázok, pektinázok), illetve szerves savak (pl. citromsav) termelői, gyógyszeralapanyagok forrásai (pl. lovasztatin, kojisav), egyes fajokat (pl. *A. oryzae*, *A. niger*) pedig gyakran alkalmaznak heterológ gének expressziójára (Adrio és Demain 2003). A nemzetség számos képviselőjét (pl. *A. glaucus*, *A. chevalieri*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. candidus*) általában raktári kártevőként tartják számon, de egyes fajok már a szántóföldeken is képesek károsítani a növényeket, így pl. az *A. flavus* kukoricán, földimogyorón és gyapoton (Varga és mtsi. 2009), az *A. niger*, *A. carbonarius* és *A. welwitschiae* szőlőn és mandulán (Somma és mtsi. 2012), az *A. welwitschiae* velvicsián (*Welwitschia mirabilis*) és hagymán (Hong és mtsi. 2013), valamint az *A. ochraceus* és rokonai kávéban, illetve fűszernövényeken okozhatnak fertőzéseket (Varga és mtsi. 2015b). A xerofil fajok (pl. *A. glaucus*, *A. chevalieri*, *A. candidus*) alacsony víztartalmú termékekben (pl. tárolt gabona, sózott hal, lekvár) is gyakran előfordulnak (Varga és mtsi. 2015a). Az *Aspergillus* fajok számos mikotoxin termelésére képesek, melyek különösen mezőgazdasági szempontból fontosak (aflatoxinok, ochratoxinok, patulin, fumonizinek, citrinin, stb.). Emellett a nemzetség egyes tagjai (pl. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*) emberi, illetve állati kórokozóként is nagy jelentőséggel bírnak (Varga és mtsi. 2015a).

Morfológiai, fiziológiai és molekuláris vizsgálatok alapján a nemzetséget 4 alnemzetségbe és 21 szekcióba sorolják (1. táblázat). A gomba-nevezéktanra vonatkozó Amszterdami Nyilatkozat értelmében csak egy binomiális név használata engedélyezett az ivaros és ivartalan alakban is előforduló gombák esetében (Hawksworth és mtsi. 2011). Az algákra, gombákra és növényekre vonatkozó Nemzetközi Nevezéktan (Melbourne Code, Hawksworth 2011a, McNeill és mtsi. 2012) jelenlegi szabályai szerint, valamint a Nemzetközi *Aspergillus* és *Penicillium* Bizottság (International Commission on *Penicillium* and *Aspergillus*; <http://www.aspergilluspenicillium.org/index.php/single-name-nomenclature/88->

[single-names/105-aspergillus-options](#)) döntése alapján az *Aspergillus* nevet választották egységes használatra (Hawksworth 2011b).

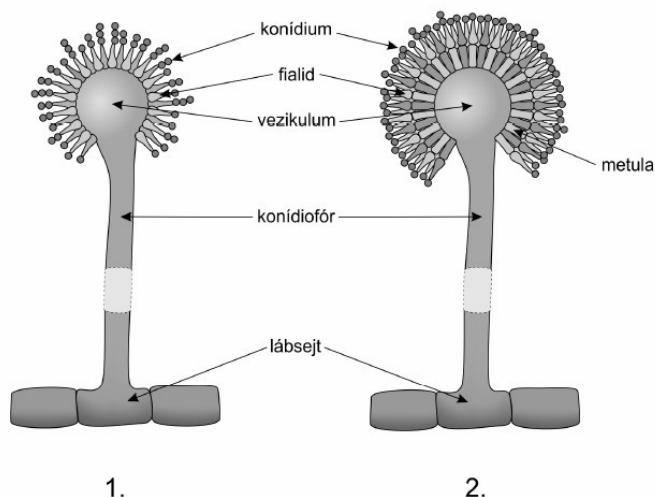
1. táblázat. Az *Aspergillus* nemzetség felosztása.

Alnemzetség	Szekció	Szexuális alak	Fontosabb fajok
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>	<i>A. glaucus</i> , <i>A. amstelodami</i> , <i>A. chevalieri</i>
	<i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i>	<i>A. restrictus</i> , <i>A. penicillioides</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. fischeri</i>
	<i>Cervini</i>	-	<i>A. cervinus</i>
	<i>Clavati</i>	<i>Neocarpentales</i> , <i>Dichotomomyces</i>	<i>A. clavatus</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i>	-	<i>A. candidus</i>
	<i>Circumdati</i>	<i>Neopetromyces</i>	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. steyni</i>
	<i>Flavi</i>	<i>Petromyces</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
	<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>	<i>A. flavipes</i>
	<i>Nigri</i>	<i>Petromyces</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. welwitschiae</i>
	<i>Terrei</i>	-	<i>A. terreus</i>
	<i>Jani</i>	-	<i>A. janus</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Aenei</i>	<i>Emericella</i>	<i>A. aeneus</i>
	<i>Bispori</i>	-	<i>A. bisporus</i>
	<i>Cremeri</i>	<i>Chaetosartorya</i>	<i>A. cremerus</i>
	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>	<i>A. nidulans</i>
	<i>Versicolores</i>	<i>Emericella</i>	<i>A. versicolor</i>
	<i>Ochraceorosei</i>	-	<i>A. ochraceoroseus</i>
	<i>Silvati</i>	-	<i>A. silvaticus</i>
	<i>Sparsi</i>	-	<i>A. sparsus</i>
	<i>Usti</i>	<i>Emericella</i>	<i>A. ustus</i>

3.1.1. Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciója

A *Flavi* szekció rendszertanilag az *Aspergillus* nemzetség *Circumdati* alnemzetségébe sorolható. Az ide tartozó fajokra jellemző a sárgászöldtől egészen a barna árnyalatig terjedő konídiumszín, sötét szkleróciumok, valamint a kétsoros (biseriate) konídiumtartó morfológia (1. ábra). A szekció tagjai közé tartozik néhány nagyon fontos aflatoxin-termelő faj is (pl. *A. flavus*, *A. parasiticus*). Az úgynevezett házasított fajokat (pl. *A. oryzae*, *A. sojae*) gyakran használják keleti fermentált termékek (szaké, szójaszószt, stb.) előállítására során (Varga és mtsi. 2011). Néhány fajt különböző genetikai vizsgálatokhoz modellorganizmusként is alkalmaznak, valamint különböző enzimek termeltetésére is használják (Pariza és Johnson 2001). A szekcióba két ochratoxin-termelő faj is tartozik, az *A. alliaceus* és az *A. albertensis*. Előbbinek

fontos szerepe van egyes mezőgazdasági termékek, például a füge és a hagyma ochratoxin-szennyezésében (Bayman és mtsi 2002).



1. ábra. *Aspergillus* konídiumtartók morfológiája (Varga és mtsi. 2015b).

1. egysoros (uniseriate, pl. *A. aculeatus*), 2. kétsoros (biseriate, pl. *A. niger*)

Az *Aspergillus* nemzetségen belül az egyes fajok pontos meghatározása hagyományos módszerekkel, pl. morfológiai bélyegek alapján (a konídiumok színe, mérete, konídiumtartók szerkezete) csak néhány faj esetén lehetséges (Klich 2002). A fajok elkülönítésére a legelfogadottabb módszer a szekvencia alapú fajazonosítás, melyre a kalmodulin vagy β -tubulin gének szekvenciái bizonyultak megfelelőnek (Varga és mtsi. 2011).

Az *Aspergillus flavus* az egyik leggyakoribb aflatoxin-termelő faj, melyet Link (1809) írt le. A fajba tartozó izolátumok csak B-típusú aflatoxinok előállítására képesek, azonban sok más gazdaságilag jelentős másodlagos metabolitot is termelnek, például ciklopiazonsavat, kojisavat, aszpertoxint, aflatremet és aszpergillánsavat. A kojisavat tirozináz-gátló aktivitásának köszönhetően alkalmazzák a kozmetikai iparban bőrfehérítőként, illetve a mezőgazdaságban gyümölcsök barnulása ellen (Hedayati és mtsi. 2007). A többi *Aspergillus* fajhoz hasonlóan az *A. flavus* is világszerte elterjedt, habár előfordulása a melegebb (trópusi, szubtrópusi) területeken gyakoribb. Optimális növekedési hőmérséklete 37 °C, de széles tartományban, akár 12 és 48 °C között is képes növekedni (Hedayati és mtsi. 2007). Az *A. flavus* nagy mennyiségű konídiumot hoz létre, melyek a levegővel terjednek. A konídiumok elsősorban felső légúti fertőzések, valamint allergiás és asztmás megbetegedések okozói

lehetnek. Az *A. flavus* általi fertőzés a második legjellemzőbb oka a humán aszpergillózisok különböző formáinak (Hedayati és mtsi. 2007, Krishnan és mtsi. 2009). Az *A. flavus* gyakran mutatható ki kórházi levegőből (Stevens és mtsi. 2000), ráadásul 2011-ben egy iráni egyetemi kórház csapvizében is kimutatták (Hedayati és mtsi. 2011). A fajba tartozó izolátumok jelentős mezőgazdasági kártevők, nagyon gyakoriak kukoricán, földimogyorón és gyapotmagon. Az aflatoxin-kontamináció miatti hozamvesztés több millió dolláros károkat okoz az Amerikai Egyesült Államokban (Robens és Cardwell 2003). Az *A. flavus* emellett az egyik legfontosabb rovarpatogén *Aspergillus* faj (Campbell 1994). A mézelő méhek esetében az *A. flavus* költésmeszesedést okoz, ami a lárvák kiszáradásában és mumifikálódásában nyilvánul meg (Vojvodic és mtsi. 2011). Az *A. flavus* törzsek nagy diverzitást mutatnak mind genetikailag, mind fenotípus szempontjából (Geiser és mtsi. 2000). A konídiumok színe táptalajtól függően változik a sárgászöldtől egészen a barnáig. Az izolátumok közül két morfológiailag könnyen megkülönböztethető szklerócium-méretbeli variánst azonosítottak. Az L-törzs, vagy az *A. flavus* Group IB-nek nevezett csoport izolátumainak átlagos szklerócium mérete nagyobb, mint 400 μm (Geiser és mtsi. 2000), míg az S-törzsbe (Group IA) tartozó izolátumok esetében a szkleróciumok 400 μm -nél kisebbek (Cotty 1997). Általános laboratóriumi tápközegben, sötétben nevelve az S-törzs nagyobb mennyiségben állít elő aflatoxint, valamint sokkal kevesebb konídiumot képez, mint az L-törzs. Az S-törzs ugyanakkor ritkán fordul elő természetes környezetben (Orum és mtsi. 1997).

Az *Aspergillus minisclerotigenes* fajt Argentínából származó földimogyoróról írták le Pildain és munkatársai (2008). Jellegzetesen kisméretű és jelentős mennyiségű szkleróciummal rendelkezik. Különböző anyagcseretermékeket, például aflatoxinokat (B_1 , B_2 , G_1 és G_2), aszpergillánsavat, ciklopiazonsavat, kojisavat, parazitikolidot és számos más másodlagos metabolitot termel. A faj világszerte elterjedt, melyet molekuláris vizsgálatok is alátámasztanak. Előfordult például Argentínában, az USA-ban, Nigériában, valamint Ausztráliában is (Pildain és mtsi. 2008).

Az *Aspergillus tamarii* fajt széles körben használják az élelmiszeriparban szójaszószt (más néven vörös Awamori koji) előállítására (Jong és Birmingham 1992), valamint a fermentációs iparban különböző enzimek (amilázok, proteázok és xilanolitikus enzimek) termeltetésére (Ferreira és mtsi. 1999, Moreira és mtsi. 2004). Legújabb kutatások szerint az *A. tamarii* konídiumai allergének lehetnek (Vermani és mtsi. 2011). Dél-Indiában 2007-ben humán keratitist előidéző fajként is azonosították (Kredics és mtsi. 2007).

Az *Aspergillus pseudotamarii* fajt Ito és munkatársai (2001) a *Flavi* szekción belüli aflatoxin-termelő fajként írták le. A telepek felületén bőségesen álló konídium fejek találhatók,

az érett kultúrákban a konídium fejek színe táptalajtól függően az olajzöldtől a narancsos barnán át egészen a világos barnáig változik. A telepek halvány sárgásbarnák, és a táptalajba azonos színű pigmenteket diffundálnak. A szkleróciumok sötétbarnák vagy feketék, gömb alakúak és 1-2 mm átmérőjűek. A konídiumtartók gömb alakúak, 500-770 μm átmérőjűek (Ito és mtsi. 2001).

Az *Aspergillus nomius* fajt Kurtzman és munkatársai (1987) írták le. Eredetileg rovarokról, illetve búzáról izolálták az USA-ban, valamint cikász fajok kártevőjeként tartották számon Polinéziában (Kurtzman és mtsi. 1987). A faj B- és G-típusú aflatoxinok előállítására egyaránt képes. A konídium fejek színe táptalajtól függően a sárgászöldtől a sárgásbarnáig változhat. A konídiumok alakja gömb vagy gömbszerű, felülete tüskézett (echinulate), méretük 4,5-6,5 μm , a konídiumtartók mérete 300-1100 μm között változik (Hedayati és mtsi. 2007). Korábban igen ritka fajnak gondolták, az utóbbi években megjelent szakirodalom viszont egyre gyakoribb megjelenéséről számolt be. Az USA-ban különböző mezőgazdasági területek földmintáiból is azonosítottak *A. nomius*-t, melyet összefüggésbe hoztak a területeken termelt gabonafélék aflatoxin-szennyezettségével (Horn és Dorner 1998, Ehrlich és mtsi. 2007). Továbbá azonosítottákogyoróról (Olsen és mtsi. 2008, Doster és mtsi. 2009) és cukornádról is (Kumeda és mtsi. 2003). Humánpatogén vonatkozásban történő első regisztrált megjelenésekor szaruhártya-gyulladást idézett elő Dél-Indiában (Manikandan és mtsi. 2009).

Az *Aspergillus pseudonomius* az *A. nomius* egy közeli rokon faja, melyet 2011-ben Varga és munkatársai írtak le. Aflatoxinok mellett krizogint és kojisavat is termel. Egysoros (uniseriate) konídiumtartók jellemzik, konídiumaik zöldes színűek, szkleróciumok nem figyelhetők meg (Varga és mtsi. 2011). Az *A. pseudonomius*-t korábban az USA-ban talajmintákból, illetve rovarokról izolálták, továbbá a brazil dió aflatoxin-szennyezettségéért tették felelőssé (Massi és mtsi. 2014).

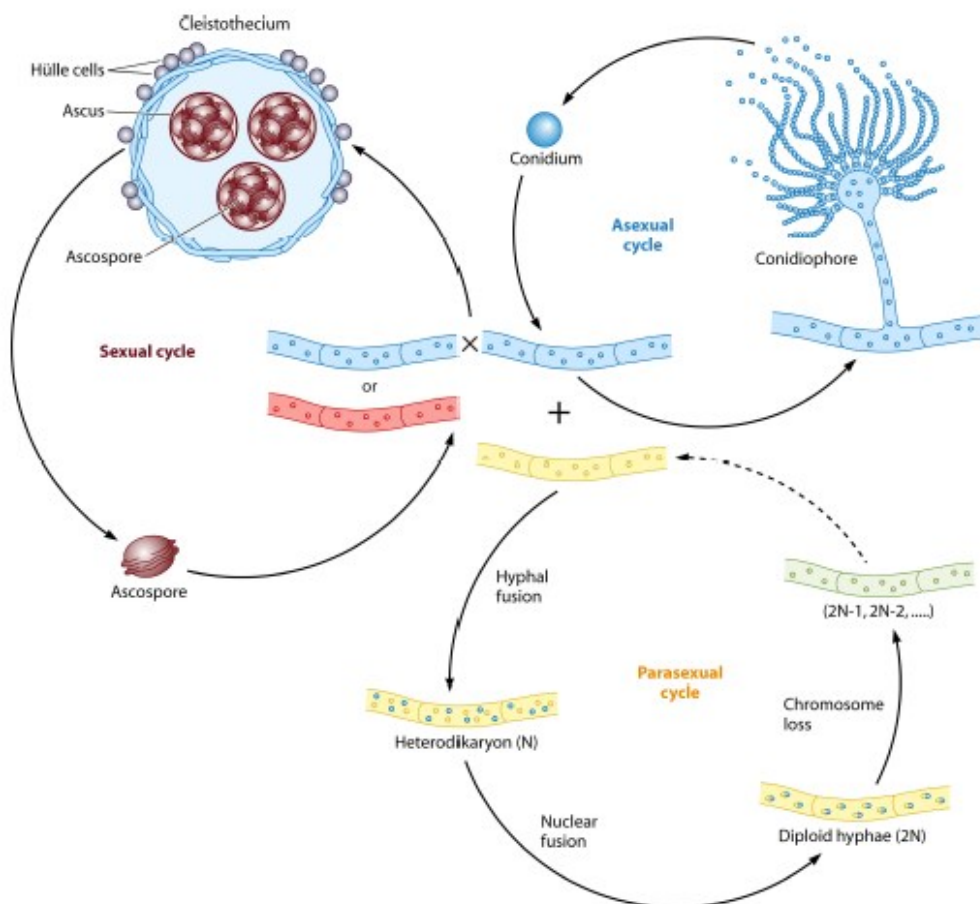
Az *Aspergillus parasiticus* fajt először Hawaii-szigeteki cukornád-ültetvények vizsgálatát követően Speare (1912) írta le. Az *A. flavus* mellett az egyik legkiemelkedőbb aflatoxin-termelő faj, azonban az *A. flavus*-szal ellentétben a B-típusú aflatoxinok mellett G-típusú aflatoxinok előállítására is képes. Konídiumai sötét sárgászöld színűek. A szkleróciumok ritkán fordulnak elő, nagyméretűek (400-700 μm), kezdetben fehérek, majd feketén pigmentálttá válnak. A konídiumtartók általában egysorosak (uniseriate), a konídiumok gömb alakúak, nagyságuk 3,5-5,5 μm , durva felszínűek (Samson és mtsi. 2010). Az *A. parasiticus* ún. házasított formája az *A. sojae*, melyet főként szójaszószer előállítására használnak.

3.2. *Aspergillus* fajok szaporodása

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok szaporodásának módja igen változatos. Ivartalan szaporodásuk során konídiumokat hoznak létre. Az *Aspergillus* fajok többségénél (a fajok 64%-a) csak az ivartalan szaporodási ciklus ismert (Dyer és O’Gorman 2011). Számos bizonyíték támasztja alá ugyanakkor, hogy a korábban szigorúan ivartalanul szaporodónak ismert *Aspergillus* fajok természetes populációiban tapasztalt génáramlás az ivaros szaporodás során történő kereszteződések és a gének rekombinációjának eredménye lehet, amely az *A. flavus* (Geiser és mtsi. 1998) és az *A. fumigatus* (Varga és Tóth 2003, Dyer és Paoletti 2005, Paoletti és mtsi. 2005) esetében is megfigyelhető. Ezenkívül több *Aspergillus* faj (pl. *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*) esetében azonosították az aszkuszos gombák szexuális ciklusának különböző szakaszaiban (párosodási folyamat, feromonválasz, meiózis, termőtest-kialakítás) szerepet játszó gének egész sorát (Lee és mtsi. 2010, Dyer és O’Gorman 2012).

Az *Aspergillus* fajok esetében az ivartalan és az ivaros fejlődést egyaránt a hifák vegetatív növekedése előzi meg, mely vagy egy konídiumból (ivartalan reprodukció mitotikus terméke), vagy egy aszkospórából (ivaros reprodukció meiótikus terméke) indul. A vegetatív növekedési szakaszt követően, a stacioner fázisban a megfelelő feltételek mellett bizonyos hifasejtek megkezdik az ivartalan szaporítóképletek kialakítását, amely magában foglalja a konidiofórképzést és a konídiumérést (Adams és mtsi. 1998, Ni és Yu 2007). A tisztán ivartalan szaporodás következtében képződő utódok a szülő organizmussal genetikailag teljes mértékben megegyeznek, így a folyamat káros mutációk felhalmozódásához vezethet, ami egyes nézetek szerint „evolúciós zsákutcát” jelent (Taylor és mtsi. 1999).

Néhány *Aspergillus* faj paraszexuális cikluson mehet keresztül, mely lehetővé teszi a rekombinációt mitózis esetén is (Pontecorvo 1956). A paraszexuális ciklus a heterokarion-képződéssel kezdődik, mely a genetikailag kompatibilis haploid (n) hifák fúziójával jön létre. A heterokarionon belül két haploid sejtmag fúziójával (kariogámia) jön létre egy diploid (2n) struktúra. A mitotikus át kereszteződés (*crossing over*) után a vegetatív sejtek továbbra is mitotikusan osztódnak, a haploid (n) kromoszómaszám pedig véletlen kromoszómavesztéssel áll vissza (2. ábra, Casselton és Zolan 2002, Lee és mtsi. 2010)



2. ábra. Az ivaros-, ivartalan- és paraszexuális ciklus az *Aspergillus nidulans* életciklusán végigkövetve (Lee és mtsi 2010).

A genetikai rekombináció és a génáramlás leginkább az ivaros szaporodás következménye. Az *Aspergillus* fajok mintegy harmada esetében ismert csak ivaros szaporodási ciklus (Dyer és O’Gorman 2011, Geiser 2009). Az aszkuszos gombák ivaros szaporítósejtjei (aszkospórák) négy termőtesttípus (aszkokarp) egyikében jönnek létre: a kleisztotécium, peritécium, apotécium és pszeudotécium. Az *Aspergillus* nemzetség tagjai esetében az aszkospórák kleisztotéciumban képződnek, amely olyan termőtesttípus, ahol az aszkospórák teljesen zárt térben fejlődnek (Dyer és O’Gorman 2012). Az ivaros fejlődés a kleisztotécium kialakításával kezdődik. Két hifapartner fúziója során létrejön a dikarion. A dikarion nukleáris fúzión megy át, melyet meiózis és posztmeiótikus mitózis követ, ezek után létrejön a 8 haploid aszkospórát tartalmazó aszkusz (2. ábra, Lee és mtsi. 2010). A kleisztotéciumot vastagfalú Hülle-sejtek vehetik körbe, melyek védősejtekként szolgálnak. A kialakult termőtest több

tízezer aszkospórát is tartalmazhat (Sohn és Yoon 2002). Az aszkospórát tartalmazó kleisztotécium esetenként szkleróciumokon belül is létrejöhet (Dyer és O’Gorman 2012).

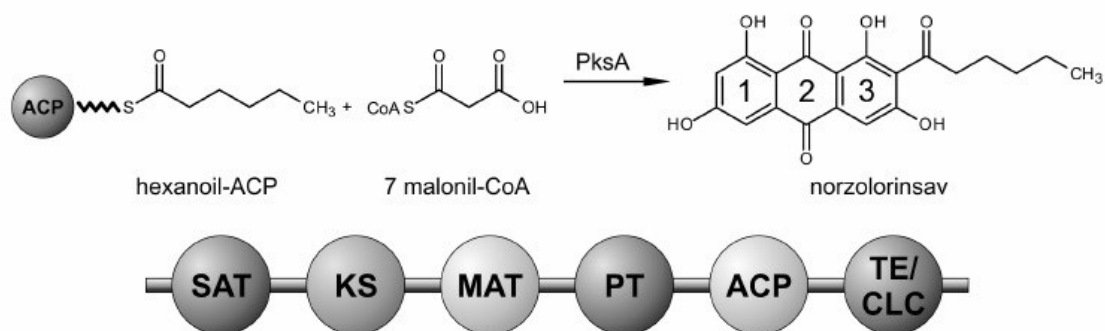
Mind a homotallikus, mind a heterotallikus *Aspergillus* fajok ivaros ciklusának szabályozásában kulcsszerepet játszanak a párosodásért felelős ún. mating-type (*MAT*) gének. A *MAT* gének transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek meghatározzák a heterotallikus fajok szexuális identitását, valamint szabályozzák a szexuális szaporodási ciklust (Debuchy és mtsi. 2010). A *MAT* gének két csoportját különböztetjük meg: a *MAT1-1* gén egy alfa box domént tartalmazó fehérjét, míg a *MAT1-2* gén egy HMG (*high-mobility group*) box domént hordozó fehérjét kódol. A homotallikus gombák (pl. *A. nidulans*) mindkét *MAT* génnel rendelkeznek, melyek egy genomon belül egymás mellett egy *MAT* lókuszon belül, vagy különböző kromoszómákon lokalizálódva helyezkednek el (Kronstad 2007, Paoletti és mtsi. 2007). Ezzel szemben a heterotallikus gombák esetében csak egy *MAT* lókusz van jelen, amely vagy a *MAT1-1* vagy a *MAT1-2* gének egyikét hordozza (Turgeon és Yoder 2000).

3.3. Az *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxinok

A mikotoxinok a fonalgombák által előállított másodlagos anyagcseretermékek, melyek az emberekre és az állatokra egyaránt károsak lehetnek (Varga és mtsi. 2009). Az elsődleges anyagcseretermékekkel ellentétben ezek a vegyületek nem elengedhetetlenül fontosak a fonalgombák növekedéséhez, viszont hozzájárulnak az adott organizmus természetes környezetben történő érvényesüléséhez. Nem fordulnak elő minden élőlényben, csak néhány faj termel egy adott vegyületet. Általában kis molekulásúak és csak egy adott életszakaszban termelődnek. Az egyes fajok által termelt másodlagos metabolitok nagymértékű változatosságot és összetettséget mutatnak (Kobayashi és mtsi. 2007, Rokas és mtsi. 2007). A másodlagos metabolitok jelentősége a mindennapi életünkben is kiemelkedő. Számos vegyületet hasznosítanak az élelmiszeriparban (kojissav, citromsav) vagy a gyógyászatban, mint például a koleszterinszintet csökkentő lovastatint. Ugyanakkor a fonalgombák által előállított másodlagos metabolitok széles skálájában megtalálhatóak az igen káros mikotoxinok is (Adrio és Demain 2003).

Az *Aspergillus* fajok által termelt fontosabb mikotoxinok az aflatoxinok, ochratoxinok, fumonizinek és a patulin, melyek felépítésüket tekintve a poliketid-típusú vegyületek közé tartoznak. A poliketid-típusú vegyületek a zsírsavakhoz hasonlóan egyszerű monomerekből épülnek fel, de az acetil- és malonil-csoportok mellett bioszintézisükben többféle monomer is részt vehet. A folyamatot katalizáló kulcsenzim a poliketid-szintáz (PKS, 3. ábra), mely a

gombagenomban általában számos más, a bioszintézisben résztvevő enzim génjével együtt, úgynevezett génklaszterben helyezkedik el (Varga és mtsi. 2015b). A poliketid szintáz felépítése és működése az aflatoxin PKS génklaszter bemutatásával jól jellemezhető. A résztvevő főbb domének: a lánchosszabbítási lépéseket katalizáló ketoszintáz (KS), az acilszállító protein (ACP), mely a növekvő terméket tartja kötve tioészter formában, starter unit-ACP-transzszaciláz (SAT), mely a hexanoát ACP doménhez kapcsolásáért felelős, a malonil-CoA-ACP transzszaciláz (MAT), amely a malonát egységeket köti, majd a termék templát (product template, PT), amely létrehozza az első két gyűrűt (1. és 2. gyűrűk a 3. ábrán). A harmadik gyűrűt (3.) a tioészteráz/Claisen-cikláz (TE/CYC) domén hozza létre, ami a poliketid leválásáért is felelős. A felépítésükben közreműködő acetát alegységek száma szerint megkülönböztetünk di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, okta-, nona- és dekaketideket.



3. ábra. Az aflatoxin-bioszintézisben szerepet játszó PKS szerkezete és a katalizált reakció (Varga és mtsi. 2015b).

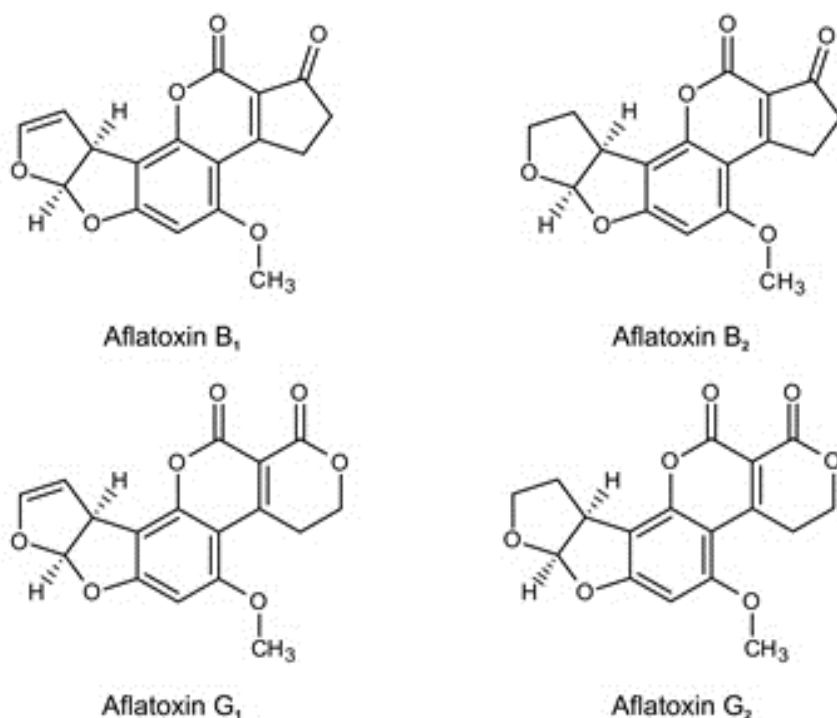
3.3.1. Aflatoxinok

3.3.1.1. Felfedezés és szerkezet

Az aflatoxinok a dekaketidek csoportjába sorolható kumarinvázis vegyületek, melyeket az 1960-as évek elején fedeztek fel. Ebben az időben egy ismeretlen betegségben (Turkey-X disease) több mint százezer pulyka pusztult el Angliában (Blout 1961, van der Zijden és mtsi. 1962). A tömeges pusztulás felderítésekor minden elhullott állat esetében májkárosodást mutattak ki. A megbetegedésekért egy fonalasgombával szennyezett földimogyoró-tartalmú takarmány volt a felelős. A fonalasgombát később *A. flavus*-ként azonosították (Sargeant és

mtsi. 1961). A takarmányban egy korábban ismeretlen toxikus anyagot is kimutattak, amely a termelő gomba után az aflatoxin (*Aspergillus flavus* toxin) nevet kapta.

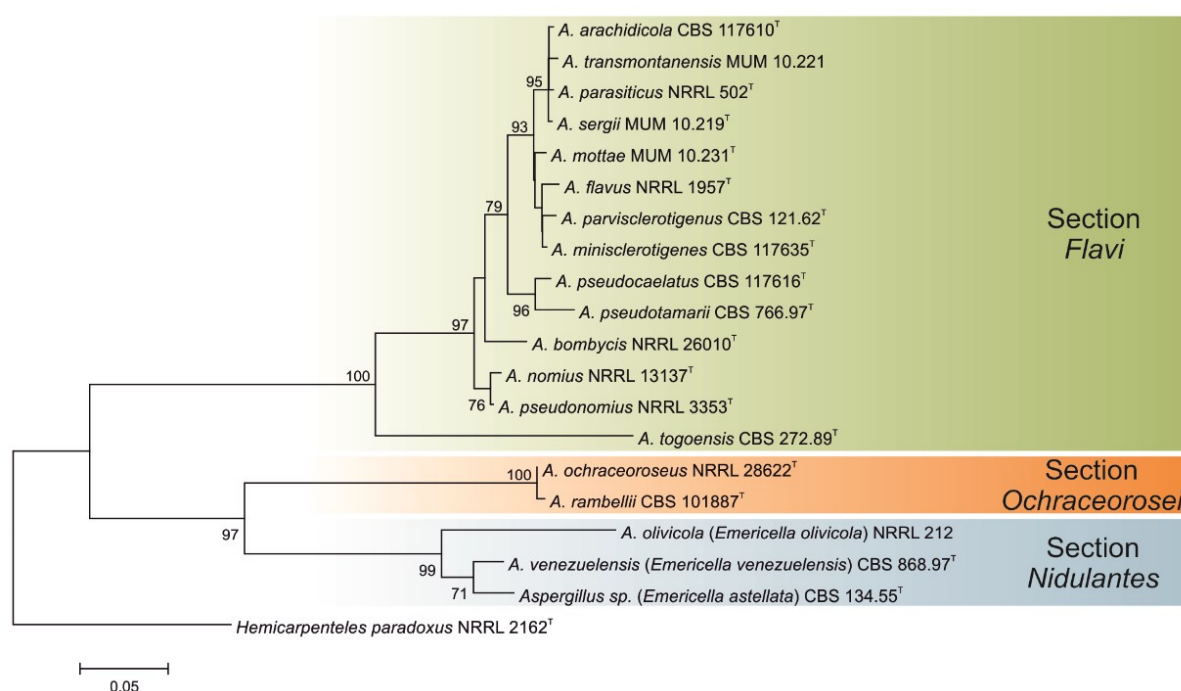
Az aflatoxinok szerkezetüket tekintve difuranokumarin-származékok, melyek egyben az egyik legalaposabban tanulmányozott mikotoxinok. UV-fény hatására mutatott fluoreszcenciájuk alapján megkülönböztetünk B- (kék), illetve G-típusú (zöld) aflatoxinokat. Az aflatoxinoknak számos szerkezeti analógja található meg a természetben, melyek közül a legjelentősebbek az aflatoxin B₁, B₂, G₁ és G₂ (4. ábra). Az aflatoxin B₁ az eddigi ismeretek alapján a legerősebb természetben előforduló rákkeltő vegyület. A toxintermelő törzsek többsége is ezt a változatot állítja elő a legnagyobb mértékben (Squire 1981, IARC 2012). Az aflatoxin B₁ egyik metabolikus terméke az aflatoxin M₁, melyet állati szövetekből és testnedvekből (pl. tej) lehet kimutatni (Varga és mtsi. 2009). Emlősökben számos más metabolikus terméket (aflatoxin P₁, Q₁, B_{2a} és G_{2a}) is leírtak, míg ammóniával kezelt kukoricából kimutatták az aflatoxin D₁-et és az *A. flavus* egyik metabolikus termékét, az aflatoxin B₃-at (Cole és Schweikert 2003, Varga és mtsi. 2009).



4. ábra. A különböző aflatoxin-származékok szerkezeti képlete.

3.3.1.2. Aflatoxin-termelő fajok

A legújabb adatok szerint legalább 20, az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható fajról bizonyították be, hogy képesek aflatoxinok előállítására (Varga és mtsi. 2009, 2011). Ezen fajok jelentős része az *Aspergillus* nemzetség három szekciójába: a *Flavi*, a *Nidulantes*, valamint az *Ochraceorosei* szekciókba sorolható. Gazdaságilag jelentős toxintermelőnek csak az *A. flavus*, *A. nomius* és *A. parasiticus* fajokat tekintik, de emellett számos más faj is termel aflatoxinokat (5. ábra, Varga és mtsi. 2012). A legújabb kutatások szerint további két rovarpatogén faj is képes aflatoxinokat előállítani. Ezek az Ascomycota gombák Hypocreales rendjébe tartozó *Aschersonia coffeae* és *Aschersonia marginata* (Kornsakulkarn és mtsi. 2012, 2013).



5. ábra. Az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható aflatoxin-termelő fajok (Baranyi és mtsi. 2013c).

3.3.1.3. Aflatoxinok előfordulása

Aflatoxinokat leggyakrabban és legnagyobb koncentrációban ezidáig földimogyoróban mutattak ki, de gyakori egyéb fehérjedús olajos magvakban is (gyapotmag, mandula, pisztácia, stb). Kimutatták már szójából, rizsből, kölesből, kávéból, kukoricából és más gabonafélékből is (Varga és mtsi. 2009). Hazánkban az aflatoxin-termelő fajok közül az *A. flavus*-t gyakran izolálják különböző mezőgazdasági terményekről (kukorica, búza, szőlő) (Dobolyi és mtsi.

2013). Aflatoxint és a termelő *A. flavus*-t még víztároló tartályból is kimutattak (Paterson és mtsi. 1997), valamint Iránban egy egyetemi kórház csapvizéből is azonosítottak már potenciálisan aflatoxin-termelő *Aspergillus* fajokat, köztük *A. flavus*-t is (Hedayati és mtsi. 2011).

Az aflatoxinok termelésének kedvez a magas hőmérséklet, ezért az *A. flavus* melegebb, trópusi és szubtrópusi területeken képes aflatoxinokat előállítani, így főként ezeken a területeken volt megfigyelhető a különböző termények nagyfokú aflatoxin-szennyezettsége (Varga és mtsi. 2009). A közép-európai országokban (Magyarország, Szerbia, Szlovénia, Horvátország, Románia, Ukrajna), melyek a mérsékelt éghajlati övben helyezkednek el, a mezőgazdasági termékek aflatoxin-szennyezettsége eddig nem jelentett komoly egészségügyi kockázatot. Az elmúlt években a szakirodalom egyre gyakrabban számol be különböző mezőgazdasági és élelmiszeripari termékek, esetenként határértéket meghaladó aflatoxin-szennyezettségéről olyan országokban is, ahol korábban ez a probléma elhanyagolható volt (Cotty és Jaime-Garcia 2007, Miraglia és mtsi. 2009, Paterson és Lima 2010, Tirado és mtsi. 2010). Ezen vizsgálatok feltételezik, hogy a klímaváltozás miatt az aflatoxin-termelő gombák, és velük együtt az aflatoxinokkal szennyezett termények is, várhatóan a mérsékelt éghajlattal rendelkező országokban is egyre inkább elterjednek.

Hazánkat tekintve Richard és munkatársai (1992) különböző régiókból összegyűjtött *A. flavus* izolátumok közül 32 véletlenszerűen kiválasztott törzs esetében vizsgálták az aflatoxin-termelő képességet. Vizsgálataikhoz kókusztej és rizs alapú táptalajt alkalmaztak és vékonyréteg kromatográfiával ellenőrizték az előállított toxinok jelenlétét. Eredményeik alapján egyik izolátum sem bizonyult aflatoxin-termelőnek, viszont az izolátumok 59%-a termelt ciklopiazonsavat. Borbély és munkatársai (2010) kelet-magyarországi gabona és kevert takarmány mintákban vizsgálták a mikotoxin-szennyezettséget. Találtak olyan mintákat, melyekben az aflatoxin B₁ meghaladta az EU-s határértéket. Dobolyi és munkatársai (2013) Magyarország különböző régióiból gyűjtött kukoricaszemekről azonosítottak aflatoxin-termelő *A. flavus* izolátumokat.

A 2012 nyarán Közép-Európában tapasztalt extrém időjárás következtében a kukorica és tej aflatoxin-szennyezettsége súlyos problémákat okozott Szerbiában, Horvátországban és Romániában. A betakarítást követően Magyarországon is számos kukorica tételben mutattak ki magas aflatoxin tartalmat (Tóth és mtsi. 2013). Az Európai Unión belül működik egy gyors riasztási rendszer (Rapid Alert System for Food and Feed), ahol nyomon követhetjük az EU különböző országaiban regisztrált vagy importált termékekben kimutatott mikotoxin szennyeződések (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>).

3.3.1.4. Aflatoxinok biológiai hatása

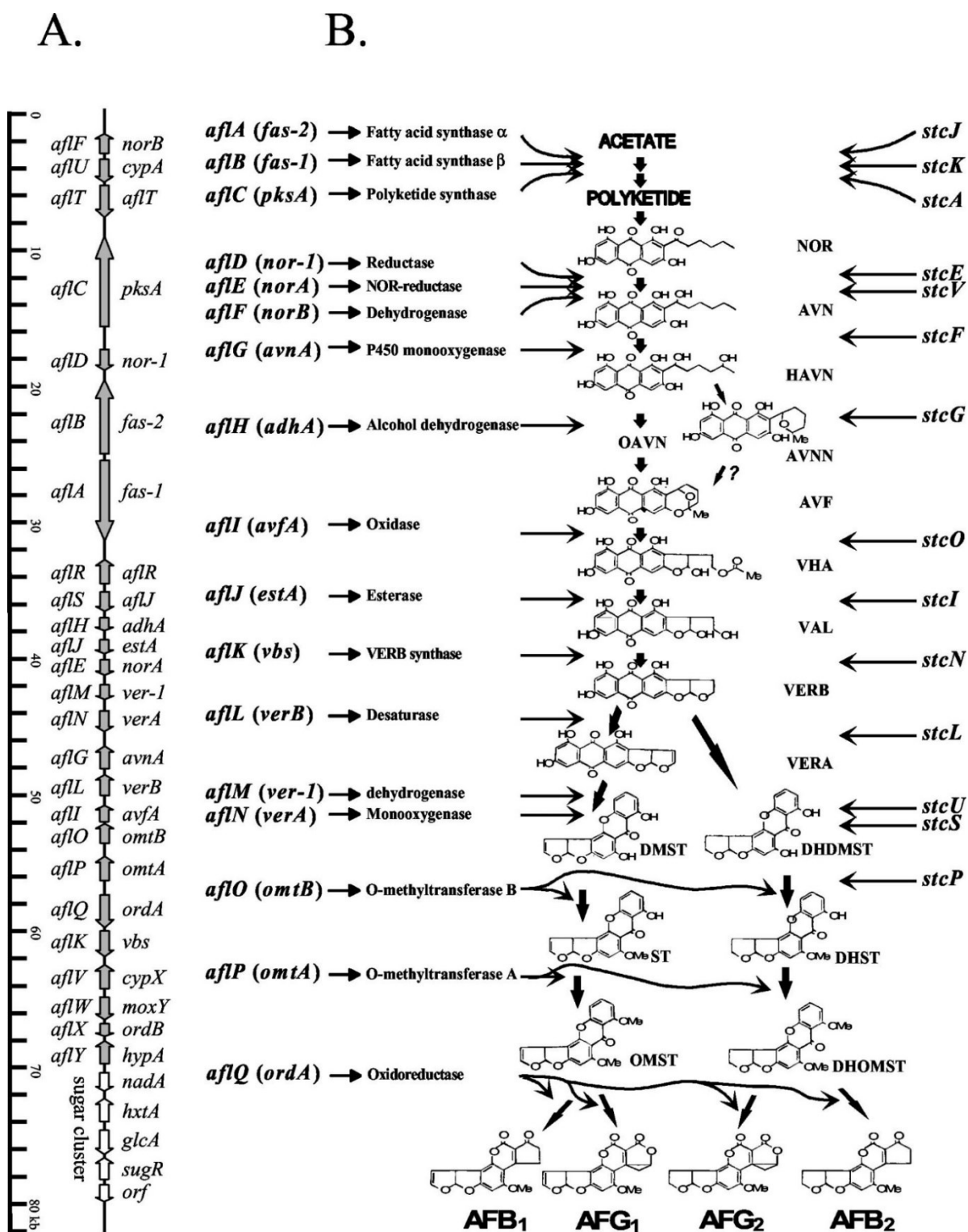
Epidemiológiai és kísérleti tanulmányok kimutatták, hogy az aflatoxinok májkárosító, hepatokarcinogén, mutagén és teratogén hatású vegyületek (Groopman és mtsi. 1996, Mayura és mtsi. 1998, Abdel-Wahhab és Aly 2003, Abdel-Wahhab és mtsi. 2005). Az aflatoxin fogyasztás következtében kialakuló betegséget aflatoxikózisnak nevezzük, melynek akut és krónikus formáját különböztetjük meg. Az aflatoxikózis kezdeti tünetei lehetnek étvágytalanság, tömegvesztés, amit gyors elhalálozás követhet (Varga és mtsi. 2009). Viszonylag nagy mennyiségű aflatoxin elfogyasztása után akut aflatoxikózis alakul ki. Az akut betegség tünetei lehetnek vérzés, akut májkárosodás, ödéma, emésztőszervrendszeri változások, a tápanyagok felszívódásában és/vagy metabolizmusában jelentkező zavarok, melyek egyes esetekben halálhoz is vezethetnek. Akut „aflatoxikózis-járvány” fordult elő 1974-ben Indiában, amely a 397 felismert esetből 108 ember halálához vezetett (Krishnamachari és mtsi. 1975). Hasonló „járványok” Kenyában 1981-ben, 2004-ben és 2005-ben több mint 150 halálesetért voltak felelősek (Ngindu és mtsi. 1982, Azziz-Baumgartner és mtsi. 2005, Lewis és mtsi. 2005). Fertőzött gabona fogyasztása által okozott akut májgyulladásról beszámoltak még Afrika egyéb területeiről, Indiából és Malajziából is (Patten 1981, Coulter és mtsi. 1986, Chao és mtsi. 1991, Lye és mtsi. 1995). A viszonylag kis mennyiségű, tartós aflatoxin fogyasztás eredménye a krónikus aflatoxikózis. Kórbonctanilag minden esetben májkárosodás mutatható ki. Az aflatoxin B₁ egyszeri toxikus dózisa a legtöbb kísérleti állatnál 0,5-10 mg/testtömeg kg intervallumba esik. A tapasztalatok alapján a fiatal hím patkányok lényegesen érzékenyebbek, mint a nőstények. A hosszabb távú aflatoxin fogyasztás okozta megbetegedések gyakorisága Dél-Afrikában, Mozambikban és Kína egyes területein a legmagasabb (Varga és mtsi. 2009). A krónikus aflatoxikózis következménye a májcirrózis, májrák, immunszuppresszió és más „lassú” patológiás folyamatok (Eaton és Groopman 1994).

3.3.1.5. Aflatoxin-bioszintézis

Az aflatoxin-termelés molekuláris hátterének vizsgálata során egy kb. 75 kb méretű génklasztert találtak az *A. flavus* és *A. parasiticus* genomban is, mely két specifikus transzkripció regulátort (*aflS* és *aflR*) és legalább 30 koregulált további gént tartalmaz, melyek az aflatoxin-bioszintézis útvonalának részeit képezik (Liu és Chu 1998, Bhatnagar és mtsi. 2003, Yu és mtsi. 2004, Georgianna és Payne 2009, Ehrlich és mtsi. 2012). A két génexpressziót szabályozó gén (*aflS* és *aflR*) egymástól szeparáltan helyezkedik el a génklaszterben, önálló promóterrel rendelkeznek, de transzkripciójuk egymástól eltérő (Georgianna és Payne 2009). Az *aflR* gén egy szekvencia-specifikus cink-ujj DNS-kötő fehérjét (Zn(II)2Cys6) kódol, mely

a struktúrgének transzkripció aktivátoraként működik (Woloshuk és mtsi. 1994, Yu és mtsi. 1996, Ehrlich és mtsi. 1998, Price és mtsi. 2006). Az *aflS* (korábbi nevén *aflJ*) gén szintén részt vesz az aflatoxin-bioszintézis regulációjában, bár pontos szerepe még nem ismert. Feltételezhetően az *aflS* az aflatoxin-bioszintézis útvonalban a korai és középső gének transzkripció enhanszereként működik (Georgianna és Payne 2009).

Az aflatoxinok bioszintézise számos, szigorúan szabályozott oxidációs és redukciós lépés során valósul meg (Bhatnagar és mtsi. 1992, Minto és Townsend 1997). Az első lépésben a malonil-koenzim A egységekből egy kondenzált norantron jön létre, a reakciót két zsírsav szintáz enzim (melyek az *aflA* és *aflB* – korábbi nevükön *fasI* és *fas2* – gének termékei) és egy poliketid szintáz enzim (mely az *aflC* gén – korábbi nevén *pksA* – terméke) katalizálja (Cary és mtsi. 2000). A *hypC* gén egy antron oxidáz enzimet kódol, ami a norantron norzolorinsavvá történő biokonverzióját katalizálja, mely a bioszintézis első stabil köztterméke (Ehrlich és mtsi. 2010). A norzolorinsavból számos lépésben jönnek létre az aflatoxinok, az averantin – hidroxiaverantin – averufin – verzikonál – verzikolorin B / verzikolorin A – dihidro-demetilsterigmatocisztin / demetil-sterigmatocisztin – dihidro-sterigmatocisztin / sterigmatocisztin – dihidro-O-metil-sterigmatocisztin / O-metil-sterigmatocisztin – aflatoxin B₂ és G₂ / aflatoxin B₁ és G₁ reakcióúton keresztül (Yu és mtsi. 2004, Ehrlich és mtsi. 2005). Az egyes közttermékek átalakulását katalizáló enzimeket, a kódoló géneket, illetve a reakciók termékeit a 6. ábra foglalja össze. A bioszintézis kulcslépése a verzikonál-hemiacetál-acetát verzikolorin B-vé történő átalakulása, ugyanis ebben a lépésben záródik az aflatoxinok biszfurán gyűrűje. A lépést a verzikolorin B szintáz enzim katalizálja (Silva és mtsi. 1996, Silva és Townsend 1996, McGuire és mtsi. 1996), melyet az *aflK* gén kódol (Yu és mtsi. 2004). A verzikolorin B verzikolorin A-vá alakulása képezi az aflatoxin-bioszintézis útvonalának elágazási pontját (Bhatnagar és mtsi. 1991, Yabe és Hamasaki 1993), a verzikolorin B ugyanis az aflatoxin B₂-vel és az aflatoxin G₂-vel megegyezően egy tetrahidrobiszfurán gyűrűt, míg a verzikolorin A az aflatoxin B₁-el és az aflatoxin G₁-el megegyezően egy dihidrobiszfurán gyűrűt tartalmaz.



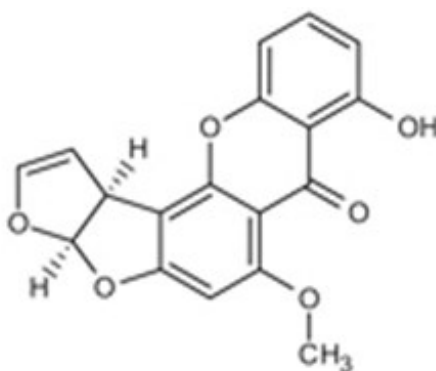
6. ábra. Az aflatoxin-bioszintézis sematikus ábrája a génklaszter és az egyes lépések feltüntetésével (Yu és mtsi. 2004).

Az aflatoxin-bioszintézis során képződő köztitermékek a következők: norzolorinsav (NOR), averantin (AVN), hidroxi averantin (HAVN), oxoaverantin (OAVN), averufanin (AVNN), averufin (AVF), verzikonál-hemiacetát-acetát (VHA), verzikonál (VAL), verzikolorin B (VERB), verzikolorin A (VERA), demetil-sterigmatocisztin (DMST), dihidro-demetil-sterigmatocisztin (DHDMST), sterigmatocisztin (ST), dihidro-sterigmatocisztin (DHST), O-metil-sterigmatocisztin (OMST), dihidro-O-metil-sterigmatocisztin (DHOMST), aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁), aflatoxin G₂ (AFG₂).

Az ábrán az *A. flavus* és *A. parasiticus* aflatoxin-bioszintézis génklaszter (A), a géntermékek által katalizált reakciók (B) és a képződő termékek kerültek feltüntetésre. Az aflatoxin-bioszintézis gének korábbi elnevezései az A panel jobb, míg a jelenleg használt elnevezés a baloldalon látható. A B panelen a gének által kódolt enzimek és ezeknek a bioszintézis egyes lépéseiben meghatározott szerepe, valamint a képződő intermedierek láthatók. A B panel jobb oldalán találhatóak továbbá az *A. nidulans* sterigmatocisztin-bioszintézis útvonalában szerepet játszó *stc* gének.

3.3.2. Sterigmatocisztin

Az aflatoxinok szerkezetileg rokon vegyülete a szintén karcinogén hatású sterigmatocisztin (7. ábra), mely az aflatoxin-bioszintézis útvonalon keresztül jön létre. Kémiai szerkezetét tekintve szintén furanofurán vázú, szubsztituált xanton vegyület. Kimutatták fűszerekben, kávéban, beltéri porban, de detektálták ivóvízben is, továbbá meglehetősen nagy mennyiségben fordulhat elő sajtokban és egyes gabonafélékben (Samson és mtsi. 2010).



7. ábra. A sterigmatocisztin szerkezeti képlete.

A sterigmatocisztint néhány filogenetikailag és fenotipikusan is igen különböző nemzetség képviselői állítják elő (Rank és mtsi. 2011). Az *A. versicolor* és rokon fajtái élelmiszerekben és beltéri levegőben a sterigmatocisztin leggyakoribb forrásai (Samson és mtsi. 2010). A sterigmatocisztinon kívül az aflatoxin közvetlen prekursor vegyületét, az O-metil-sterigmatocisztint is kimutatták *Chaetomium cellulolyticum*, *C. longicolleum*, *C. malaysiense* és *C. virescens* fajok esetében (Rank és mtsi. 2011). Emellett egy újonnan leírt faj, az *Aspergillus bertholletius* ex-típustörzse is képes volt O-metil-sterigmatocisztint előállítani, mely jelezte, hogy a genomban az aflatoxin-bioszintézisért felelős génklaszter is megtalálható (Taniwaki és mtsi. 2012). Habár a sterigmatocisztin az aflatoxinok prekursor vegyülete, az

aflatoxin-termelők közül csak az *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii* (Frisvad és mtsi. 1999, Klich és mtsi. 2000) és néhány az *Aspergillus* nemzetség *Nidulantes* szekciójába tartozó faj képes sterigmatocisztint és aflatoxint is akkumulálni (Frisvad és mtsi. 2004c, Frisvad és Samson 2004). Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának tagjai, melyek közé a legjelentősebb aflatoxin-termelők sorolhatók, nagy hatékonysággal alakítják át a sterigmatocisztint 3-metilsterigmatocisztinen keresztül aflatoxinná (Frisvad és mtsi. 1999). Egyetlen kivétel található ebben a szekcióban, az *A. togoensis*, mely képes sterigmatocisztint és aflatoxint is előállítani (Wicklow és mtsi. 1989, Rank és mtsi. 2011). Biológiai hatásait tekintve a sterigmatocisztinre az aflatoxin B₁-hez hasonlóan májkárosító és tumorképző hatás jellemző, viszont a toxikus és rákkeltő hatás eléréséhez az aflatoxin B₁-hez képest tízszeres mennyiség szükséges (Varga és mtsi. 2012).

3.3.3. Egyéb fontos mikotoxinok

A **patulin** egy tetraketid laktonvegyület, melyet számos gombanemzetség, pl. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Byssoschlamys* képviselői termelnek (Puel és mtsi. 2010). Amíg a különböző *Penicillium* fajok főként gyümölcsök (pl. alma, cseresznye, szőlő) patulin-fertőzéséért felelősek (Frisvad és mtsi. 2004b, Puel és mtsi. 2010), addig a gabonafélék patulin-szennyezése *Aspergillus* fajokkal hozható összefüggésbe. A klasszikus patulin-termelő *A. clavatus* mellett említést érdemel az *A. giganteus* és az *A. longivesica* is (Varga és mtsi. 2007). A vegyület gyenge antibiotikus hatással rendelkezik, viszont a magasabbrendű élőlényeken tapasztalt toxicitása, továbbá az élelmiszerekben és takarmányokban észlelt gyakori előfordulása miatt mikotoxinnak kell tekintenünk (Varga és mtsi. 2012).

Az **ochratoxinok** ciklikus pentaketid vegyületek. A leginkább toxikus forma az ochratoxin A (OTA), melyet 1965-ben *A. ochraceus* szűrletéből azonosítottak (van der Merwe és mtsi. 1965). Kevésbé toxikus formája az ochratoxin B (OTB), mely az OTA klórmentes változata. Az ochratoxinok szennyezhetnek különböző gabonákat (pl. búza, árpa) és gabonából készített termékeket (pl. sör), szárított gyümölcsöket (füge, mazsola), fűszereket, kávé, kakaót, szőlőt és szőlőből készült termékeket (pl. bor), valamint szennyezett élelmiszer elfogyasztását követően vérből és tejből is kimutathatók (Varga és mtsi. 2001). A hideg mérsékelt éghajlaton elsősorban a *Penicillium*, a meleg mérsékelt, illetve trópusi éghajlatokon inkább az *Aspergillus* nemzetség tagjai felelősek az ochratoxin-szennyezésért (Frisvad és mtsi. 2004a). Az *Aspergillus* nemzetségen belül a *Nigri*, *Flavi* és *Circumdati* szekciók egyes tagjai képesek termelni (Visagie és mtsi. 2014). Az ochratoxinok biológiai hatásukat tekintve nefrotoxikusak, immunszuppresszív, teratogén és karcinogén hatású vegyületek (Varga és mtsi. 2001). Az IARC

(2012) a 2b csoportba sorolta az ochratoxin A-t, vagyis abba a csoportba, mely az emberekre nézve feltételezhetően rákkeltő vegyületeket tartalmazza.

A **fumonizinek** nonaketid-származékok, melyeket főként *Fusarium* fajok termelnek. 1988-ban fedezték fel kukoricáról izolált *F. verticillioides* vizsgálatokkor (Gelderblom és mtsi. 1988). Napjainkig közel 100 különböző fumonizin izomert sikerült azonosítani, közülük a leggyakoribbak és toxikológiai szempontból is a legjelentősebbek a B csoportba tartozó fumonizinek, közülük is a fumonizin B₁, B₂ és B₃. Az *Aspergillus* fajok közül az *A. niger* és az *A. welwitschiae* is képes fumonizin B₂-t és más fumonizin-analógokat termelni (Samson és mtsi. 2007). Genomjukban a fumonizinek termeléséért felelős génklaszter a *Fusarium* fajokéval nagyfokú homológiát mutat (Frisvad és mtsi. 2007). Elsősorban kukorica esetében okoz komoly károkat a fumonizin-szennyezés, amelyért főként *Fusarium* fajok tehetők felelőssé, viszont szőlőn és szőlő alapú termékeken az *A. niger*, míg hagymaféléken elsősorban az *A. welwitschiae* okolható ezért (Varga és mtsi. 2012). Haszonállatok esetében súlyos kórképeket idéz elő a fumonizinnel szennyezett takarmány fogyasztása: lovaknál agylágyulást, sertésekben tüdővízenyőt okozhat (Stockmann-Juvala és Savolainen 2008). Emberek esetében összefüggésbe hozták a nyelőcsőrák kialakulásával (Chu és Li 1994). Az IARC (2012) a 2b csoportba sorolta a fumonizineket, mivel rákkeltő hatásuk még nem bizonyított.

3.4. *Aspergillus flavus*, mint humánpatogén

Az *Aspergillus* fajok nagy gyakorisággal okoznak mikózisokat legyengült immunrendszerű betegekben. Ennek fő okai a szervátültetések növekvő száma és ezzel összefüggésben a modern immunszuppresszáns terápiák terjedése (Cohen és mtsi. 1993). A fertőzés leggyakrabban a légzőszervrendszerben jelentkezik, de szemfertőzést (keratitisz) és fülfertőzést (otitisz) is okozhatnak. Az *A. fumigatus* a fonalgombák okozta fertőzések leggyakoribb kiváltója, de más *Aspergillus* fajok, mint például az *A. flavus*, *A. terreus* és az *A. niger* fajkomplex tagjai is jelentős opportunistá humánpatogének (Latgé 1999). Az *A. fumigatus* után az *A. flavus* az invazív és nem invazív aszpergillózis második leggyakoribb előidézője (Morgan és mtsi. 2005).

Az *A. flavus* humán megbetegedések széles skáláját okozhatja, kezdve a túlérzékenységi reakcióktól az angioinvázióval társult invazív fertőzésekig. A fertőzés kialakulásának elsődleges forrása a gombák konídiumainak belégzése. Feltehetőleg az *A. flavus* *A. fumigatus*-nál (23 µm) nagyobb, 25 µm-es konídiummérete okolható azért, hogy elsősorban a felső légúti traktusban idéz elő fertőzést. Ez lehet az oka annak is, hogy az *A. flavus* gyakran idéz elő

szinuszitiszt (orrmelléküreg-gyulladás), illetve bőrfertőzéseket, invazív gombás tüdőgyulladást viszont nem (Hedayati és mtsi. 2007). A méret mellett a konídiumok felszíni sajátosságai is jelentős szerepet játszhatnak a lokalizációban (Morrow 1980). Az *A. flavus* okozta megbetegedések helyi megjelenésének fontos meghatározója a klíma és egyéb földrajzi tényezők. A félsivatagos, sivatagos területeken (pl. Szaúd-Arábia, Szudán) az *A. flavus* az invazív aszpergillózis fertőzések fő kórokozója (Kameswaran és mtsi. 1992, Khairallah és mtsi. 1992).

3.4.1. Légzőszervrendszert érintő főbb megbetegedések

Habár az *A. fumigatus* tehető felelőssé az **allergiás bronchopulmonáris aszpergillózisok** (*allergic bronchopulmonary aspergillosis*, ABPA) túlnyomó többségéért, mégis néhány esetben, főként Indiában, az *A. flavus* is jelentős szerepet játszik a betegség kialakulásában (Chakrabarti és mtsi. 2002). Az *A. flavus* komplex fajai által okozott ABPA egyes foglalkozási tevékenységek következtében is kialakulhat. Több felmérés készült a 80-as évek végén Japánban, miszerint a szójababból készült termékek előállításakor a dolgozók nagy mennyiségű *A. oryzae* konídiumot lélegezhetnek be, amely ABPA kialakulásához vezetett (Akiyama és mtsi. 1987, Kurosawa és mtsi. 1990).

Néhány *Aspergillus* fajról már bebizonyosodott, hogy **allergénként** hatnak, ezek az *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* és *A. oryzae*. Több mint 20 allergén hatású fehérjét azonosítottak *A. fumigatus*-ban, kettőt *A. flavus*-ban és további négyet *A. oryzae*-ben (Mari és Riccioli 2004). A mai genomszekvenálási projektek lehetővé teszik az *Aspergillus* fajokban a lehetséges allergén hatású fehérjék felmérését. Bizonyították, hogy az *A. fumigatus*-ban található allergén hatású fehérjét kódoló gének egy része megtalálható az *A. flavus* genomjában is, amelyek összehasonlítva nagyobb mint 90% azonosságot mutatnak. Ezért azt feltételezik, hogy az *A. flavus* sokkal több allergén hatású fehérjét képes termelni, mint amennyiről jelenleg tudomásunk van (Asp fl 13 és Asp fl 18), és az *A. fumigatus*-hoz hasonló allergénnel rendelkezhet (Hedayati és mtsi. 2007).

Az *A. flavus* sokkal gyakrabban fedezhető fel a felső légzőtraktusban, mint más *Aspergillus* fajok (Kennedy és mtsi. 1997, Iwen és mtsi. 1997, Panda és mtsi. 1998). Az *Aspergillus*-ok által okozott **rhinoszinuszitisz** (orrmelléküreg-gyulladás) klinikai formái az akut- vagy krónikus invazív fertőzés, a krónikus granulomás és nem invazív szindrómák lehetnek (Hope és mtsi. 2005).

Az *Aspergillus* fajok közül az **allergiás gombás szinuszitisz** (*allergic fungal sinusitis*, AFS) leggyakoribb előidézője az *A. fumigatus*, viszont néhány földrajzi területen, főként

Indiában és a Közép-Keleten, az *A. flavus* is meglehetősen gyakran izolálható ezekből a fertőzésekből (Taj-Aldeen és mtsi. 2003, 2004, Thakar és mtsi. 2004, Saravanan és mtsi. 2006). A **szinusz aszpergillóma**, amit szintén elsősorban az *A. fumigatus* és az *A. flavus* okoz, kevésbé gyakori a fejlett országokban (Ferreiro és mtsi. 1997).

3.4.2. Keratitisz

Különféle mikroorganizmusok által okozott fertőzések a szem bármelyik részét érinthetik, de leggyakrabban a szaruhártyán jelentkeznek (Srinivasan és mtsi. 1997). A gombák által okozott keratitisz (más néven keratomikózis) a szaruhártya gyulladásos megbetegedése, mely gyakran válhat gennyessé, fekélyessé, látásromlást, súlyosabb esetekben vakságot előidézve (Thomas 2003). Elsősorban a trópusi, szubtrópusi fejlődő országokban jellemző, ahol a kezeletlen szürkehályog után a gombák által okozott keratitisz a monokuláris vakság második leggyakoribb oka (Srinivasan és mtsi. 1997). A keratitist előidéző fajok előfordulása meglehetősen változatos, még egy ország különböző területein is mutathat eltérést (Manikandan és mtsi. 2008, 2013). India déli részein a *Fusarium* fajokat azonosítják leggyakrabban (Bharathi és mtsi. 2006), az ország északi területein viszont az *Aspergillus* fajok tekinthetők domináns gombás keratitist előidéző patogéneknek (Chowdhary és Singh 2005, Saha és Das 2006).

A keratitisz kialakulására hajlamosító tényezők lehetnek, többek között, például a hosszú ideig tartó kortikoszteroid-kezelés, a nem megfelelő antibiotikumos kezelés, cukorbetegség, egyéb szembetegségek vagy kontaktlencse viselése (Thomas 2003). Fő fertőzési forrása a növényi részek által okozott szemsérülés, elsősorban a mezőgazdasági munkások körében. Ilyen jellegű sérülést különböző növényi részek mellett, sár, homok, porszemcsék, hántolatlan gabonaszemek, faágak vagy akár fémdarabok is okozhatnak (Srinivasan és mtsi. 1997, Thomas 2003). Az *Aspergillus* fajok közül elsősorban az *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* és *A. niger* tekinthetők a leggyakoribb szemfertőzést okozó patogéneknek (Srinivasan és mtsi. 1997, Thomas 2003, Chowdhary és Singh 2005, Saha és Das 2006).

3.4.3. Egyéb megbetegedések

Krónikus tüdőaszpergillózt (*chronic cavitary pulmonary aspergillosis*, CCPA) és aszpergillómát is szinte kizárólagosan az *A. fumigatus* idéz elő (Denning és mtsi. 2003). Eddig

nem tisztázott okokból *A. flavus*-t csak nagyon ritkán hoztak összefüggésbe CCPA-s esetekkel (Staib és mtsi. 1983).

A legtöbb esetben az *Aspergillus* fajok okozta **bőrfertőzések** az *A. flavus*-nak tulajdoníthatók (van Burik és mtsi. 1998, Chakrabarti és mtsi. 1998). A posztoperatív aszpergillózisok kialakulásáért is a műtőkben jelenlévő *Aspergillus* konídiumok felelősek, így az *A. flavus* különösen nagy jelentőséggel bír különböző sebfertőzések kórokozójaként.

A regisztrált posztoperatív *Aspergillus* **endokarditiszes** esetek több mint 50%-áért az *A. fumigatus* tehető felelőssé, emellett más fajok is, pl. *A. terreus*, *A. niger* és az esetek 11,2%-ában az *A. flavus* okolható (Pasqualotto és Denning 2006). *Aspergillus* fajok okozta központi idegrendszeri fertőzéseket legyengült immunrendszerű betegekben regisztráltak Pakisztánban, Indiában, Szaúd-Arábiában és néhány afrikai országban. Az *A. flavus* okozta **kraniocerebrális aszpergillózis** a legtöbb esetben a krónikus granulomás szinuszitisz szövődményeként alakult ki (Rudwan és Sheikh 1976, Hussain és mtsi. 1995, Panda és mtsi. 1998).

Az *Aspergillus* fertőzések megfelelő kezeléséhez nagyon fontos a klinikai *Aspergillus* izolátumok fajsztípus meghatározása, ugyanis a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre. Ezáltal a kórokozó gomba fajsztípus ismerete segíthet a megfelelő gombaellenes terápia kiválasztásában. Az *Aspergillus* fajok által okozott fertőzések kezelésekor a leggyakrabban polién-, azol- és echinokandin-típusú gombaellenes szereket vagy ezek kombinációit alkalmazzák (Manikandan és mtsi. 2008).

3.5. A klinikumban alkalmazott fontosabb gombaellenes szerek

Az invazív aszpergillózisban szenvedők esetszáma és ezen betegek kórházi kezelési költségei jelentős mértékben növekedtek az utóbbi néhány évtizedben (Groll és mtsi. 1996, Dasbach és mtsi. 2000). Az invazív aszpergillózisok nagymértékű elterjedéséért elsősorban az új, intenzív kemoterápiás kezelések, a nagy dózisban alkalmazott kortikoszteroidok, a szerv- és csontvelő-transzplantációk növekvő száma, valamint az autoimmun betegségekkel szemben alkalmazott immunszuppresszív terápia tehetők felelőssé (Denning 1998). A fertőzések hatékony kezelésének érdekében újabb és újabb gombaellenes szereket fejlesztenek, vagy a régebbi szerek újabb, korszerűbb formáit (ciklodextrin-itrakonazol, liposzomális nystatin, PEG-amfotericin B) alkalmazzák. Emellett intenzív kísérletek folynak különböző antifungális hatású vagy antifungális és nem-antifungális hatású szerek kombinációjával is (Steinbach és Stevens 2003).

Számos, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott *in vitro* vizsgálati módszer áll rendelkezésre az egyes fertőzést okozó *Aspergillus* fajok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének megállapítására. Ilyen módszerek lehetnek a különböző makro- és mikrodilúciós tesztek, valamint az agar-alapú diffúziós módszerek (Espinel-Ingroff és mtsi. 1997, Moore és mtsi. 2000, Espinel-Ingroff 2003, Rodriguez-Tudela és mtsi. 2003). A gyakorlatban a világszerte elfogadott referencia módszerek a fonalgombák gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének megállapítására a *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) által közzétett mikrodilúciós növekedési tesztek. A mikrodilúció előnye a bizonyított reprodukálhatóság, viszont nagyon idő- és munkaigényes módszer (Shi és mtsi. 2010). Az E-teszt könnyen kivitelezhető és megfelelő alternatívát jelenthet a klinikai vizsgálatok során. Számos tanulmány foglalkozott a mikrodilúciós és E-teszt módszerek összehasonlításával, melyek során megállapították, hogy az E-teszt módszerrel nyert adatok legalább 90%-os egyezést mutattak a mikrodilúcióval kapott adatokkal *Aspergillus* fajok vizsgálata esetén (Espinel-Ingroff 2001, Messer és mtsi. 2007).

3.5.1. Polién-típusú gombaellenes szerek

A polién makrolidek (amfotericin B, nystatin és lipid formuláik) a gombaellenes szerek egyik legrégebbi csoportját alkotják. Hatásukat a gombák citoplazma membránjában nagy mennyiségben megtalálható ergoszterolhoz kötve fejtik ki. A kötődés következtében a sejtmembránban csatornák jönnek létre, ennek hatására nő a sejt permeabilitása az egy- és kétértékű kationokkal szemben, végül végzetes protongrádiens változást követően sejthalál következik be (Meis és Verweij 2001, Steinbach és Stevens 2003).

Az **amfotericin B**-t már 1958 óta alkalmazzák invazív aszpergillózis kezelésére (Stevens és mtsi. 2000). Mivel a vegyület vízben oldhatatlan, ezért a klinikumban az amfotericin B egy detergens deoxikoláttal alkotott 3:7 arányú keverékét alkalmazzák (Gallis és mtsi. 1990, Latgé 1999). Akut és krónikus toxicitása miatt toleranciája limitált. A toxicitás hátterében a drog hatásmechanizmusa áll, ugyanis a gombákban található ergoszterol mellett a humán sejtek membránjában jelenlévő koleszterollal is interakcióba léphet (de Pauw 2000). Az amfotericin B-vel történő kezelést követően a betegek közel 80%-ánál vesekárosodást tapasztaltak (Gallis és mtsi. 1990). A hagyományos amfotericin B mellett több, különböző lipidekkel társított formulát is létrehoztak, amely lehetővé teszi az emelt dózisu alkalmazást, a célszervhez (pl. tüdő, máj, lép) történő jobb eljuttatást, illetve a toxicitás csökkenését (Proffitt és mtsi. 1991, Dismukes 2000). Egy újabb liposzomás amfotericin B formula a PEG-amfotericin B, mely a polietilén-glikol 1900 (PEG) és az amfotericin B hidrofíl foszfolipid-

származéka (van Etten és mtsi. 2000). Az amfotericin B hatásosnak tekinthető számos gombával szemben (bizonyos *Candida*, *Aspergillus* és járomspórás gombafajok), viszont primer rezisztenciát mutat rá az *A. terreus* és esetenként az *A. flavus* is (Loeffler és Stevens 2003). Egyes *Aspergillus* fajok által okozott keratitisz esetében felületi kezelésként alkalmazzák.

A poliének közé sorolt **nystatin** az elsőként alkalmazott polién-típusú gombaellenes szer, melyet 1949-ben fedeztek fel (Hazen és Brown 1950). Toxicitása, illetve oldhatósági problémák miatt a nystatint csak, a felületi fertőzés helyén alkalmazzák (Arikan és Rex 2001). Az újabb liposzómás nystatinok csökkent toxicitást, valamint a nystatinnál jelentősen alacsonyabb minimális gátlási koncentráció (MIC) értékeket mutattak (Steinbach és Stevens 2003).

A **natamycin**, más néven pimaricin a polién makrolidek közé sorolható vegyület, melyet a *Streptomyces natalensis* termel. Szélesspektrumú gombaellenes szer, melyet gyakran alkalmaznak *Aspergillus*, *Fusarium* vagy *Candida* fajok által okozott gombás keratitisz kezelésében (Thomas 2003, Manikandan és mtsi. 2008). Általában topikálisan alkalmazzák szemcsepp vagy krém formájában.

3.5.2. Azol-típusú gombaellenes szerek

Az azolok heterociklikus szintetikus vegyületek, melyek gátolják a gombákban a citokróm P450 függő 14 α -demetilázt. Az enzim az ergoszterol-bioszintézis egy késői lépését katalizálja, így az azolok a lanoszterol demetilációjának gátlásával az ergoszterol prekursorok felhalmozódását idézik elő, amelynek során zavart okoznak a membrán permeabilitásában és a membránkötött enzimek aktivitásában (Walsh és mtsi. 2000, De Beule és Van Gestel 2001). Az azolok az azolgyűrűben található nitrogének száma szerint imidazolokra (két nitrogént tartalmazók) és triazolokra (három nitrogént tartalmazók) oszthatók (Meis és Verweij 2001).

A **mikonazol** alkalmazták elsőként hatásosan szisztémás fertőzés kezelésére. Használata igen korlátozott volt, ugyanis csak intravénásan adható. Hatása az amfotericin B-hez hasonló, viszont csak kevésbé toxikus (Stevens 1977).

Az imidazolok közé tartozó **ketokonazol** volt az első orálisan alkalmazott azol-típusú gombaellenes szer (Borelli és mtsi. 1979). Hátránya, hogy gyakran tapasztalható rezisztencia a szerrel szemben, emellett a humán szteroid bioszintézisre is jelentős hatást gyakorol (Kontoyiannis és Lewis 2002). A többi imidazolhoz hasonlóan a ketokonazol sem hatásos *Aspergillus* fajokkal szemben (Steinbach és Stevens 2003).

A **flukonazol** a triazolok közé sorolható, orálisan és intravénásan is alkalmazott gombaellenes szer, mely a ketokonazolhoz képest sokkal szelektívebben gátolja a citokróm P-450 függő 14 α -demetilázt (Kontoyiannis és Lewis 2002). A legtöbb *Candida* és *Cryptococcus* faj ellen hatásos az invazív fertőzéseket okozó penészekkel (pl. *Aspergillus*) szemben viszont nem mutat aktivitást (Loeffler és Stevens 2003).

Az **itrakonazol** széleskörű *in vitro* aktivitást mutat *Candida* és *Aspergillus* fajokkal szemben is (Loeffler és Stevens 2003). A ketokonazolhoz hasonlóan a droginterakciók és a gyenge felszívódás miatt gyakran figyelhető meg rezisztencia a klinikumban, ezenkívül keresztrezisztencia is kialakulhat flukonazzal szemben (Kontoyiannis és Lewis 2002).

A **vorikonazol** egy második generációs triazol, szintetikus flukonazol-származék. Mind fungicid (Espinel-Ingroff 2001), mind fungisztatikus (Sabo és Abdel-Rahman 2000) hatását kimutatták *Aspergillus* fajokkal szemben, járomspórás gombákkal szemben ugyanakkor nem hatásos (Sun és mtsi. 2002).

A **posakonazol** egy második generációs triazol, az itrakonazol rokon vegyülete (Steinbach és Stevens 2003). *In vitro* fungicid hatással rendelkezik *Aspergillus*, *Fusarium* és bizonyos járomspórás gombafajokkal szemben (Kontoyiannis és Lewis 2002). Shivaprakash és munkatársai (2011) egy átfogó vizsgálatban 188 *A. flavus* izolátum különböző gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységet határozták meg, melynek során megállapították, hogy az azolok közül a posakonazol bizonyult a leghatékonyabbnak.

3.5.3. Echinokandin-típusú gombaellenes szerek

Az echinokandinok ciklikus hexapeptidek, melyek az 1,3- β -D-glükán non-kompetitív gátlása révén blokkolják a gombák sejtfal bioszintézisét (Walsh és mtsi. 2000, Ernst 2001). Az 1,3- β -D-glükán egy eszenciális sejtfal poliszacharid, mely a gombák sejtfalának integritását biztosítja (Bartizal és mtsi. 1997). Mivel a gombák sejtfala olyan összetevőket is tartalmaz, amelyek a természetben máshol nem fordulnak elő, ezért ezek szelektív gátlásán alapulva ezek a gombaellenes szerek az emlős sejteket nem károsítják. Az echinokandinok gátolják a hifavégek és az elágazási pontokban a hifák növekedését, viszont az idősebb, szeptált sejteket, ahol csökkent a glükán-szintézis, már nem pusztítják el (Graybill 2001).

A **kaspofungin** egy fungicid hatású gombaellenes szer, mely a pneumokandin B₀ fél-szintetikus származéka (Chiller és mtsi. 2000). Parenterálisan alkalmazzák, orális alkalmazás esetén ugyanis alacsony a felszívódás mértéke (Hajdu és mtsi. 1997). Egy *in vitro* vizsgálat során 107 *Aspergillus* izolátum (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* és *A. nidulans*) kaspofunginnal, azokkal (posakonazol, vorikonazol, itrakonazol) és amfotericin B-vel

szembeni érzékenységet határozták meg (Shi és mtsi. 2010). A MIC értékek alapján minden vizsgált izolátum esetében a kaszopofungin bizonyult a leghatékonyabbnak.

A **mikafungin** egy echinokandin-lipopeptid keverék, mely a többi echinokandinhoz hasonlóan fungisztatikus hatású az *Aspergillus* fajokkal szemben (Walsh és mtsi. 2000, Tawara és mtsi. 2000). Az **anidulafungin** egy félszintetikus echinokandin B-származék (Zhanel és mtsi. 1997). Martos és munkatársai (2010) 67 *Aspergillus* izolátum (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* és *A. glaucus*) esetében vizsgálták különböző echinokandinok gombaellenes hatását E-teszttel és mikrodilúciós módszerrel. Az eredmények alapján a mikafungin és az anidulafungin a kaszopofunginnál hatásosabbnak bizonyult. Egy másik *in vitro* vizsgálat során számos gombaellenes szer hatását vizsgálták 188 *A. flavus* izolátummal szemben. A vizsgált echinokandinok közül az anidulafungin bizonyult a leghatásosabbnak (Shivaprakash és mtsi. 2011).

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az *A. flavus* jelentős humánpatogén faj, továbbá mezőgazdasági vonatkozásban súlyos hozamveszteségeket okozhat világszerte a raktározott, illetve a szántóföldi termények fertőzésével. Emellett az egyik legfontosabb aflatoxin-termelő faj. Az aflatoxinok bizonyítottan rákkeltő hatású mikotoxinok, melyek az embereket és az állatokat egyaránt károsíthatják. Ezért munkánk során célunk volt különböző területekről származó, *Aspergillus* izolátumok jellemzése és genetikai variabilitásának vizsgálata.

A következő konkrét célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Potenciális aflatoxin-termelő *Aspergillus* fajok izolálása és szekvencia alapú azonosítása

Különböző földrajzi területekről származó klinikai és környezeti izolátumok gyűjtését és ezen izolátumok a kalmodulin gén egy szakaszának szekvenciája alapján történő fajsztípus meghatározását terveztük elvégezni.

2. Klinikai izolátumok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységeinek vizsgálata

A Dél-Indiából származó *Aspergillus* izolátumok esetében a klinikumban is használt gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatát E-teszt módszerrel terveztük vizsgálni.

3. Az izolátumok aflatoxin-termelő képességének vizsgálata

A potenciálisan aflatoxin-termelő izolátumok esetében a toxintermelést vékonyréteg kromatográfiás módszerrel, majd a termelt toxinmennyiségek meghatározását HPLC módszerrel terveztük megállapítani.

4. Genetikai variabilitás vizsgálata UP-PCR és mikroszatellit-analízissel

Számos molekuláris meghatározási módszer áll rendelkezésünkre, melyek segítségével az *Aspergillus* fajok genotípus változatait azonosíthatjuk. Ezek közül UP-PCR analízissel, valamint a mikroszatellit fragment hossz polimorfizmus analízissel terveztük végrehajtani a különböző élőhelyekről származó *A. flavus* izolátumok közti genetikai variabilitás vizsgálatát.

5. Párosodási típus gének vizsgálata

Az egyes *A. flavus* izolátumok által hordozott párosodási típus gének (*MAT1-1* vagy *MAT1-2*) jelenlétét a *MAT* gének bizonyos konzervált régióira tervezett specifikus primerpárokkal elvégzett PCR reakcióval terveztük meghatározni.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Alkalmazott *Aspergillus* izolátumok

A kísérleteink során alkalmazott *Aspergillus* izolátumokat az 1. számú melléklet tartalmazza. A különböző földrajzi területekről és forrásból származó közel 200 törzs elérhető a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékének törzsgyűjteményében (Szeged Microbiological Collection, SZMC, <http://www.sci.u-szeged.hu/microbiology/>). A felhasznált törzsek egy része Dél-Indiából (Aravind Eye Hospital, Coimbatore, Tamilnadu) szaruhártya fertőzésekből, valamint környezeti mintákból származik. A törzsek másik részét Közép-Európa különböző területeiről izoláltuk: magyarországi klinikai mintákból, mezőgazdasági termékekről, sajtról és beltéri levegőből származó izolátumok, beltéri levegőből izolált törzsek Horvátországból és kukoricáról izolált törzsek Szerbiából.

5.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

YPD (*yeast extract – peptone – dextrose*) táptalaj: 1% élesztőkivonat, 1% pepton, 1% D-glükóz, 2% agar.

YPD (*yeast extract – peptone – dextrose*) tápoldat: 1% élesztőkivonat; 1% pepton; 1% D-glükóz.

CYA (*Czapek – yeast – autolizate*) táptalaj (Biolab, Magyarország).

MEA (*malt extract agar*) táptalaj (Biolab, Magyarország).

PDA (*potato dextrose agar*) táptalaj (Biolab, Magyarország).

DRBC (*dichloran – rose bengal – chloramphenicol*) táptalaj: 0,5% pepton; 1% D-glükóz; 0,1% kálium-dihidrogén-foszfát; 0,05% magnézium-szulfát; 2 mg/l diklorán; 25 mg/l bengálvörös; 100 mg/l kloramfenikol; pH 5,6.

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) Auto ModTM kiegészített táptalaj E-teszthez: 1,03% RPMI 1640 Auto ModTM por (Sigma-Aldrich, USA) kiegészítve 30 mg/ml L-glutammal; 2% D-glükózzal és 2% agarral; pH 7,0.

RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) Auto ModTM tápoldat: 1,03% RPMI 1640 Auto ModTM por (Sigma-Aldrich, USA) kiegészítve 30 mg/ml L-glutaminnal; pH 7,0.

YES (*yeast extract – sucrose*) tápoldat: 2% élesztőkivonat; 20% szacharóz.

BHI (*brain heart infusion*) tápoldat (Oxoid, UK).

5.3. Alkalmazott pufferek és reagensek

Gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na₂EDTA

Agaróz gél: 1 vagy 1,5% agaróz TAE pufferben oldva

Mintapuffer: 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific)

Festék: GR Green DNA Stain (Excellgen)

Kapilláris gélelektroforézishez használt anyagok

QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen)

QX Alignment Marker 15 bp/3 kb (Qiagen)

QX DNA Size Marker 25-500bp v2.0 (Qiagen)

DNS tisztításhoz használt anyagok

Lízis puffer: 10 m/V% Na-lauril-szarkozin bidesztillált vízben oldva

5 M Na-acetát bidesztillált vízben oldva, ecetsavval pH 5,0-ra állítva

Egyéb felhasznált anyagok

Bengálvörös (Fluka): 3',4',5',6'-tetraklór-2',4',5',7'-tetrajód-fluoreszcein-dinátrium só 25 mg/ml törzsoldat steril desztillált vízben oldva

Diklorán (Aldrich): 2,6-dikloro-4-nitroanilin 20 mg/ml törzsoldat acetonban oldva

Aflatoxin extrakcióhoz használt anyagok:

Diklórmétán (VWR) az aflatoxin extrakcióhoz

Futtatóelegy: Toluol/etil-acetát/hangyasav (VWR) 6:3:1 arányú elegye

Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatához használt E-teszt csíkok:

Anidulafungin (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

Mikafungin (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

Kaszpofungin (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

Amfotericin B (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

Flukonazol (0,016-256 µg/ml) (BioMerieux)

Vorikonazol (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

Itrakonazol (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

Posakonazol (0,002-32 µg/ml) (BioMerieux)

5.4. Tenyésztési körülmények

Mintavétel során alkalmazott tenyésztési körülmények:

A különböző növényi mintákat (70%-os alkoholos lemosást követően) DRBC táptalajra helyeztük. A lemezeket 25 °C-on sötétben inkubáltuk és időszakosan ellenőriztük a növekvő micéliumokat. A kifejlett micéliumokból oltókaccsal MEA táptalajra oltottunk tovább a tisztatenyészetek eléréséig.

Gombatörzsek tenyésztése, fenntartása:

A gombatörzseket MEA táptalajon tenyésztettük 25 °C-on, sötétben, átlagosan 5-7 napig. A gombatörzsek fenntartása MEA táptalajon 4 °C-on történt, kéthavonkénti átoltással.

Tenyésztési körülmények aflatoxin-termelés vizsgálatához:

A tenyészeteket a kísérlettől függően 2 ml YES, BHI vagy RPMI tápoldatban neveltük 7-10 napig 25, 30 vagy 35 °C-on, megvilágítás nélkül.

5.5. Vizsgálati módszerek

5.5.1. Genomi DNS tisztítása

A genomi DNS tisztításához a micéliumokat 1 ml YPD tápoldatban tenyésztettük 5-7 napig 25 °C-on 10 g rázatás mellett. A micéliumot mikrocentrifugálással (17000 g, 20 perc) választottuk el a tápoldattól. A micéliumok feltárása 300 µl lízis puffer hozzáadását követően kvarchomokkal történő dörzsöléssel történt. A lízis elősegítéséhez a mintákat 15-20 percig 70

°C-on, majd ezt követően 15 percig 4 °C-on inkubáltuk. A fehérjék kicsapására 150 µl 5 M nátrium-acetát oldatot használtunk. Centrifugálást (17000 g, 20 perc) követően a vizes fázishoz azonos térfogatú izopropanol hozzáadásával 25 percig 4 °C-on inkubálva kicsaptuk a DNS-t, majd centrifugálással (17000 g, 15 perc) üleptítettük. A csapadékot 70%-os etanollal kétszer mostuk, majd centrifugálással (17000 g, 2 x 5 perc) üleptítettük. A csapadékot vákuum alatt (Savant SpeedVac® DNA 110) beszárítottuk, majd 30 µl steril bidesztillált vízben visszaoldottuk.

5.5.2. DNS gélelektroforézis

A tisztított DNS-t, illetve egyes PCR termékeket 1/6-od térfogatú mintapuffer hozzáadása után, 1%-os agaróz gélben, 10 V/cm feszültség mellett horizontális gélelektroforetikus készülék segítségével választottuk el. A UP-PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélben, 5 V/cm feszültség mellett választottuk el. A DNS festéséhez az agaróz gélhez a gyártó utasítását követve 10000x hígításban alkalmazva GR Green DNA Stain oldatot adtunk. A fragmentumok méretének meghatározásához Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) molekulasúly markert használtunk. Elválasztást követően a fragmentumokat 254 nm-es UV-átvilágítással tettük láthatóvá, majd UVP gëldokumentációs rendszerrel készítettük el a gëlfotókat.

A mikroszatellit-analízis során nyert fragmentumok hosszának meghatározását kapilláris gélelektroforézissel végeztük. Az analízist QIAxcel Advanced System (Qiagen) készülékkel végeztük el.

5.5.3. DNS fragmentumok izolálása agaróz gëlből

A DNS fragmentumokat tartalmazó gëlrészletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki az 1% agarózt tartalmazó gëlből. Az agaróz gëlből a GenJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) segítségével izoláltuk vissza a DNS-t a gyártó utasításának megfelelően. A nyert DNS mintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

5.5.4. PCR technikák

A kísérleti munka során többféle PCR módszert használtunk. A reakciók során alkalmazott primereket a 2. táblázat foglalja össze. A kívánt gënszakaszok sokszorozására a MJ Mini Gradient Thermal Cycler készüléket (Bio-Rad) használtuk.

2. táblázat. A kísérletek során alkalmazott primerek.

Primer	Szekvencia	Ismétlődő szekvencia	PCR termék hossza (bp)
A szekvencia alapon történő fajazonosítás során alkalmazott primerek (Hong és mtsi. 2005)			
Cmd5	5' CCGAGTACAAGGAGGCCTTC 3'	-	~600
Cmd6	5' CCGATAGAGGTCATAACGTGG 3'	-	~600
A UP-PCR analízis során alkalmazott primerek (Bulat és mtsi. 1994, 1998, Naumov és mtsi. 1997, Lübeck és mtsi. 1998)			
AA2M2	5' CTGCGACCCAGAGCGG 3'	-	változó
AS4	5' TGTGGGCGCTCGACAC 3'	-	változó
3-2	5' TAAGGGCGGTGCCAGT 3'	-	változó
AS15	5' GGCTAAGCGGTCGTTAC 3'	-	változó
AS15inv	5' CATTGCTGGCGAATCGG 3'	-	változó
L15/AS19	5' GAGGGTGGCGGCTAG 3'	-	változó
L45	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	-	változó
L21	5' GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT 3'	-	változó
A mikroszatellit-analízis során alkalmazott primerek (Hadrich és mtsi. 2013)			
AFLA1 F AFLA1 R	5' CGTTGGCATGTTATCGTCAC 3' 5' CTACTGAATGGCGGGACCTA 3'	AC	245-307
AFLA3 F AFLA3 R	5' CTGAAAGGGTAAGGGGAAGG 3' 5' CACGCGAACTTATGGGACTT 3'	TAGG	173-229
AFLA7 F AFLA7 R	5' GCGGACACTGGATGAATAGC 3' 5' AACAAATCGGTGGTTGCTTC 3'	TAG	256-282
AFPM3 F AFPM3 R	5' CCTTTCGCACTCCGAGAC 3' 5' CACCACCAGTGATGAGGG 3'	(AT) ₆ AAGGG CG(GA)	196-209
AFPM4 F AFPM4 R	5' AGCGATACAGTTTTAACACC 3' 5' TCTTGCTATACATATCTTCACC 3'	CA	184-224
AFPM7 F AFPM7 R	5' TTGAGGCTGCTGTGGAACGC 3' 5' CAAATACCAATTACGTCCAACAAGGG 3'	AC	233-284
A párosodási típus meghatározásához alkalmazott primerek (Ramírez-Prado és mtsi. 2008)			
M1F M1R	5' ATTGCCCATTTGGCCTTGAA 3' 5' TTGATGACCATGCCACCAGA 3'	-	396
M2F M2R	5' GCATTCATCCTTTATCGTCAGC 3' 5' GCTTCTTTTCGGATGGCTTGCG 3'	-	270

A törzsek szekvencia alapon történő fajazonosításához Hong és mtsi. (2005) által a kalmodulin gén egy szakaszára tervezett primereket használtuk (2. táblázat).

A PCR reakcióelegy összetétele (20 µl végtérfogatban):

Dream Taq Master Mix (Thermo Scientific) mely a következőket tartalmazta:

- Dream Taq DNS polimeráz Dream Taq pufferben
- 0,2-0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 2 mM MgCl₂

4-4 pmol primer

10-100 ng DNS templát

A reakció körülményei:

1 ciklus	94 °C	2 perc	elődenaturáció
35 ciklus	94 °C	30 másodperc	denaturáció
	56 °C	40 másodperc	primer kötődés
	72 °C	45 másodperc	láncszintézis
1 ciklus	72 °C	2 perc	végző láncszintézis

A UP-PCR reakcióelegy összetétele (20 µl végtérfogatban):

1x Dream Taq puffer (amely 1,5 mM MgCl₂-ot tartalmaz) (Thermo Scientific)

0,02 mM dNTP mix (Thermo Scientific)

5,6 pmol primer

1 U Dream Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific)

10-100 ng DNS templát

A reakció körülményei:

1 ciklus	94 °C	2 perc	elődenaturáció
35 ciklus	94 °C	40 másodperc	denaturáció
	58 °C	1 perc	primer kötődés
	72 °C	1 perc	láncszintézis
1 ciklus	72 °C	2 perc	végző láncszintézis

A mikroszatelit-analízis során alkalmazott PCR reakcióelegy összetétele (20 µl végtérfogatban):

1x DreamTaq puffer (amely 1,5 mM MgCl₂-ot tartalmaz) (Thermo Scientific)
 0,02 mM dNTP mix (Thermo Scientific)
 4-4 pmol primer
 1 U Dream Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific)
 10-100 ng DNS templát

A reakció körülményei:

1 ciklus	94 °C	5 perc	elődenaturáció
30 ciklus	94 °C	30 másodperc	denaturáció
	54 °C	30 másodperc	primer kötődés
	72 °C	30 másodperc	láncszintézis
1 ciklus	72 °C	10 perc	végso láncszintézis

A párosodási típus gének vizsgálata során alkalmazott PCR reakcióelegy összetétele (20 µl végtérfogatban):

Dream Taq Master Mix (Thermo Scientific), mely a következőket tartalmazta:

- Dream Taq DNS polimeráz Dream Taq pufferben
- 0,2-0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 2 mM MgCl₂

4-4 pmol primer

10-100 ng DNS templát

A reakció körülményei a *MAT1-1* / *MAT1-2* gének egy szakaszának felsokszorozására:

1 ciklus	94 °C	1 perc	elődenaturáció
35 ciklus	94 °C	30 másodperc	denaturáció
	52 / 56 °C	45 másodperc	primer kötődés
	72 °C	1 perc	láncszintézis
1 ciklus	72 °C	2 perc	végso láncszintézis

5.5.5. DNS fragmentumok szekvenálása és a szekvenciák elemzése

A tisztított DNS fragmentumok nukleotid sorrendjének meghatározását az LGC céggel (Berlin, Németország) végeztettük. A szekvenciák kiértékeléséhez a BioEdit (©Tom Hall) és az NCBI honlapján található Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programokat használtuk. Az illesztéseket a MEGA 6 programmal (Tamura és mtsi. 2013) és a MAFFT program v7.266 verziójával G-INS-i beállítás (Kato és Standley 2013) használatával és manuális kiigazításokkal végeztük. A rokonsági viszonyok meghatározásához a törzsfákat a MEGA 6 (Tamura és mtsi. 2013), valamint a RAxML (Stamatakis 2014) programok segítségével készítettük a GenBank adatbázisból és a saját adatbázisunkból származó referencia törzsek alkalmazásával.

5.5.6. Aflatoxin-termelő képesség vizsgálata

Az aflatoxin-termelő képesség megállapítására a törzseket 2 ml YES tápoldatban 7 napig 25 °C-on megvilágítás és rázatás nélkül tenyésztettük (Davis és mtsi. 1966). A vizsgálat során minden törzs esetében két biológiai párhuzamost alkalmaztunk. Az aflatoxin extrakciót azonos mennyiségű diklórmétán (VWR) hozzáadásával végeztük. A vizsgálat során a mintákat háromszor 15 másodpercig kémcsőkeverővel közepes fordulatszámon kevertettük az extrakció nagyobb hatékonysága érdekében. A mintákat ezután 6500 g-n 20 percig centrifugáltuk, majd az alsó szerves fázist mikrocentrifuga csövekbe gyűjtöttük és levegőn 55 °C-os melegítés mellett bepároltuk.

A bepárolt mintákat vékonyréteg kromatográfiás vizsgálathoz 50 µl kloroformban visszaoldottuk. A 20x20 cm-es TLC szilikagél 60 (Merck) lapokra 10 µl mintát vittünk fel CAMAG Linomat 5 mintafelvívő berendezés segítségével. Standardként Mycotoxin Mix 1 (Aflatoxins) biopure (Romer Labs) elegyet használtunk, mely az alábbi koncentrációkban tartalmazta az egyes aflatoxin formákat: B₁- 2,01 µg/ml; G₁- 2,03 µg/ml; B₂- 0,503 µg/ml és G₂- 0,504 µg/ml. Futtatóelegyként toluol/etil-acetát/hangyasav keverékét (6:3:1, v/v) használtuk. Az elválasztást 25-30 percig végeztük, majd néhány perc száradást követően UV fény (365 nm) alatt megfigyeltük a sávokat.

A HPLC analízishez a bepárolt mintákhoz 200 µl n-hexánt és 50 µl trifluoro-ecetsavat adtunk és 30 másodpercig kevertettük, majd 10 percig 25 °C-on inkubáltuk. Ezután 200 µl acetonitril/víz keverékével (1:9, v/v) alaposan összekevertük. A fázisok szétválását követően az alsó vizes frakciót fiolákba gyűjtöttük, melyből 5 µl-t injektáltunk a HPLC analízishez. A vizsgálat során egy moduláris HPLC (Shimadzu) rendszert használtunk, amely DGU-14A vákum gáztalanítóval, két LC-20AD pumpával, SIL-20A automata mintaadagolóval, CTO-

10ASVP oszlop termosztáttal, RF-20A fluoreszcens detektorral és CBM-20A rendszer ellenőrzővel volt felszerelve. A rendszert a ClassVP 6.14 szoftver vezérelte.

A nyert adatok statisztikai analízisét GraphPad Prism (v 5.01 for Windows, GraphPad Software) programmal végeztük, a szignifikancia megállapításához kétmintás t-próbát használtunk. Statisztikailag $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak a különbséget.

5.5.7. Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata

A vizsgálathoz használt törzseket PDA táptalajon 7 napig 35 °C-on előtenyésztettük (Espinell-Ingroff és Rezusta 2002). A micéliumokról vízben oldott 1%-os Tween-80 oldattal lemostuk a konídiumokat, majd Bürker-kamrás számolást követően 1×10^6 CFU/ml-re hígítottuk. Az E-teszt csíkokat (BioMerieux) a gyártó utasításait követve használtuk fel, miszerint 2% D-glükózzal kiegészített RPMI 1640 táptalajra 200 μ l szuszpenziót szélesztettünk, majd felhelyeztük a tesztcsíkokat. Az inkubáció 35 °C-on történt, majd a MIC értékeket 24 és 48 óra elteltével is leolvastuk.

5.5.8. Genetikai variabilitás vizsgálata

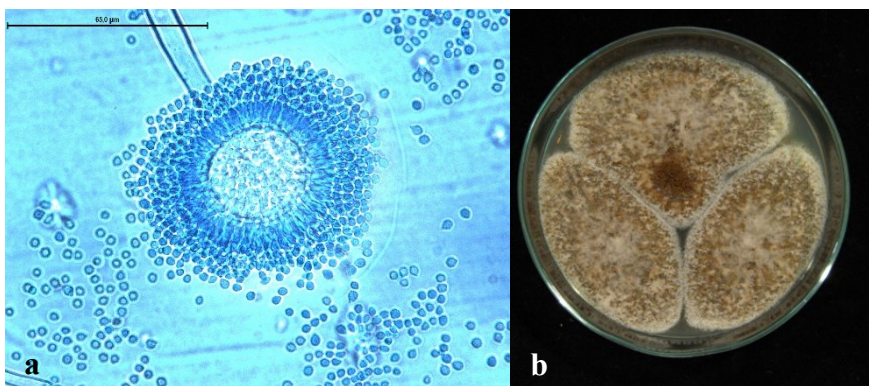
A UP-PCR analízis során nyert adatokat vizuálisan kiértékeltek. A fragmentum mintázatok alapján azokat a sávokat használtuk fel az analízishez, melyek megfelelő erősségűnek bizonyultak és a két független ismételten is jelen voltak. A fragmentumok jelenlétét (1), illetve hiányát (0) kódoló bináris mátrixot hoztunk létre. A mikroszatellit-analízis során nyert adatokból az ismétlődések számán alapuló, 21 változót tartalmazó mátrixot hoztunk létre. A UP-PCR és a mikroszatellit adatokat egyenként is kiértékeltek. UP-PCR esetén a PhylTools program segítségével, míg mikroszatellit analízis esetében a Microsatellite Toolkit program segítségével számoltuk ki a genetikai távolságokat. A törzsfák elkészítését a MEGA6 programmal végeztük. A genetikai variabilitás további vizsgálatához a kalmodulin szekvencia adatokat, az UP-PCR analízis és a mikroszatellit-analízis során nyert adatokat együtt vizsgáltuk a RAxML program v 8.1.21 verziójával, Maximum Likelihood analízist használva GTR+ Γ modell alkalmazásával (Stamatakis 2014). A kalmodulin adatsor exonok és intronok alapján, míg az UP-PCR mátrix adatai a felhasznált primerek során nyert fragmentumok száma alapján került particionálásra, míg a mikroszatellit adatok egy partíciót alkottak. Az analízis 1000 “bootstrap” ismétlésig futott, a törzsfát a FigTree 1.4.2 programmal vizualizáltuk (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), a vizsgálathoz kulcsoportként az *A. tamarii* SZMC 3077 jelű törzsét használtuk.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1. Potenciális aflatoxin-termelő *Aspergillus* fajok izolálása és szekvencia alapú azonosítása

A kísérleteink során alkalmazott törzsek egy része Dél-Indiából (Aravind Eye Hospital, Coimbatore, Tamilnadu) szaruhártya fertőzésekből (keratitisz), valamint környezeti mintákról (fertőzött növényi részek, talaj, termékek) származtak. A klinikai izolátumokat Indiában előzetes morfológiai vizsgálatok alapján *A. flavus*-ként azonosították. Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába tartozó fajok viszont pusztán hagyományos morfológiai vizsgálatok alapján nem különböztethetők meg egymástól (Frisvad és mtsi. 2005, Varga és mtsi. 2011), ezért a pontos fajazonosítást a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia alapú vizsgálatával végeztük el. A vizsgált törzsek másik része Közép-Európa különböző területeiről származott, mint például légúti fertőzésekből származó klinikai izolátumok, mezőgazdasági termékekről (kukorica, búza) és beltéri levegőből izolált törzsek Magyarországról, beltéri levegőből izolált törzsek Horvátországból és kukoricáról izolált törzsek Szerbiából. A környezeti mintákat (különböző termékek, talaj, növényi részek, stb.) szelektív táptalajra (DRBC) helyeztük, majd időszakosan ellenőriztük a növekvő micéliumokat. A tisztatenyészeteket MEA táptalajon tartottuk fenn, majd elvégeztük a DNS tisztítást és a Cmd5 és Cmd6 primerek alkalmazásával a kalmodulin gén alapján történő fajazonosítást.

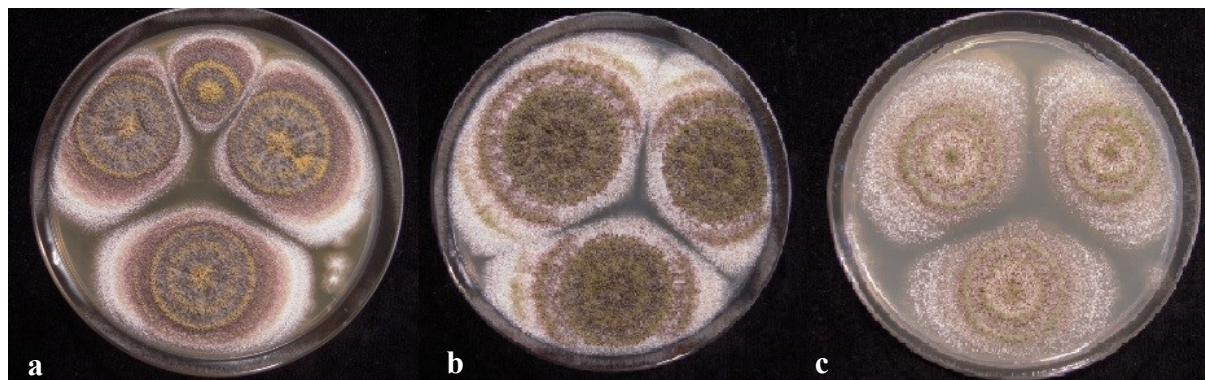
A fajazonosítást követően megállapítottuk, hogy a 77 dél-indiai klinikai izolátum közül 70 a morfológiai vizsgálatok alapján is feltételezett *A. flavus* fajba sorolható, azonban 5 az *A. tamarii*, 1 az *A. terreus*, míg 1 az *A. pseudotamarii* fajba tartozott (8. ábra). Az *A. pseudotamarii* fajt elsőként azonosítottuk, mint humán keratitist előidéző fajt (Baranyi és mtsi. 2013a).



8. ábra. *Aspergillus pseudotamarii* (Baranyi és mtsi. 2013a).

A konídiumtartóról készült fénymikroszkópos felvétel (a) és telepmorfológia CYA táptalajon 7 nap inkubációt követően (b).

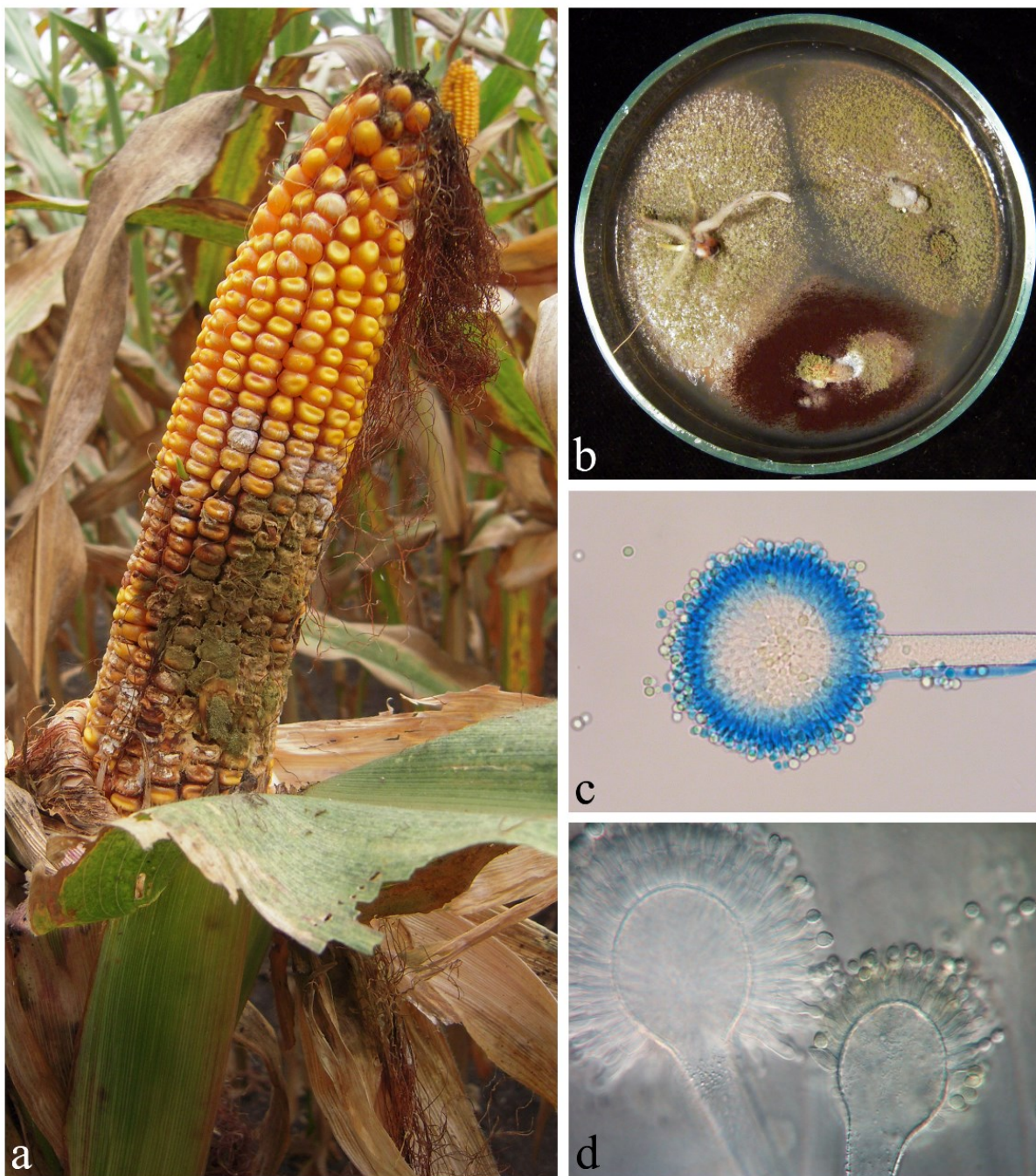
A Dél-Indiából származó környezeti minták esetében morfológiai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy 22 izolátum tartozott az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába. Az izolátumok fajszerű azonosítását követően 21 izolátum az *A. flavus*, míg 1 az *A. minisclerotigenes* fajba tartozott (9. ábra).



9. ábra. *Aspergillus minisclerotigenes* telepmorfológiája MEA (a), CYA (b) és PDA (c) táptalajokon 7 nap inkubációt követően.

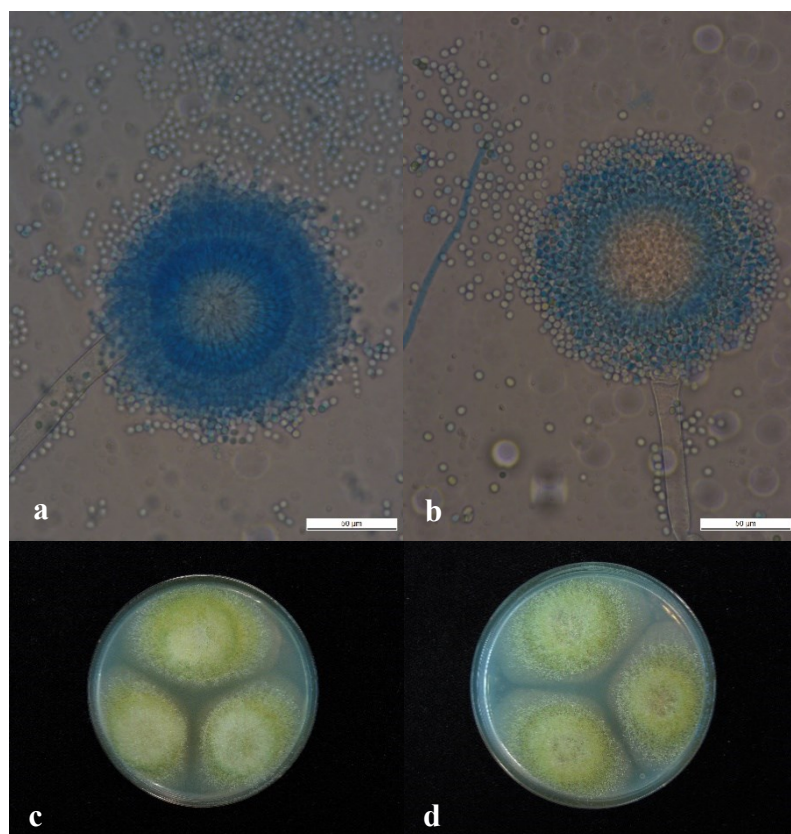
A vizsgált izolátumok másik része közép-európai területekről származott. Magyarországot tekintve 14 kukoricáról, 21 búzáról, 5 beltéri levegőből és 16 klinikai forrásból származó *A. flavus* törzset vizsgáltunk (10. ábra). Szerbiából (Óbecse, Vajdaság) 25 kukoricáról származó *A. flavus* izolátumot, míg Horvátországból 10 beltéri levegőből származó izolátumot azonosítottunk és vontunk be további vizsgálatainkba.

Kutatásaink során hazai sajtminták mikrobiotájának vizsgálatakor elsőként írtuk le az *A. nomius* faj előfordulását Közép-Európában (11. ábra). Az *A. nomius* az *A. flavus* és *A. parasiticus* mellett igen jelentős aflatoxin-termelő faj, mely B-típusú aflatoxinok mellett G-típusú aflatoxinok előállítására is képes (Baranyi és mtsi. 2015a). Szerbiából származó kukoricaminták vizsgálatakor elsőként sikerült *A. pseudonomius*-t azonosítanunk Közép-Európában (11. ábra; Baranyi és mtsi. 2015a). A horvátországi beltéri levegőből származó minták vizsgálatakor két izolátumot *A. parasiticus*-ként azonosítottunk, mely szintén B- és G-típusú aflatoxinok előállítására is képes (Baranyi és mtsi. 2015a).



10. ábra. *Aspergillus flavus* (Baranyi és mtsi. 2013c).

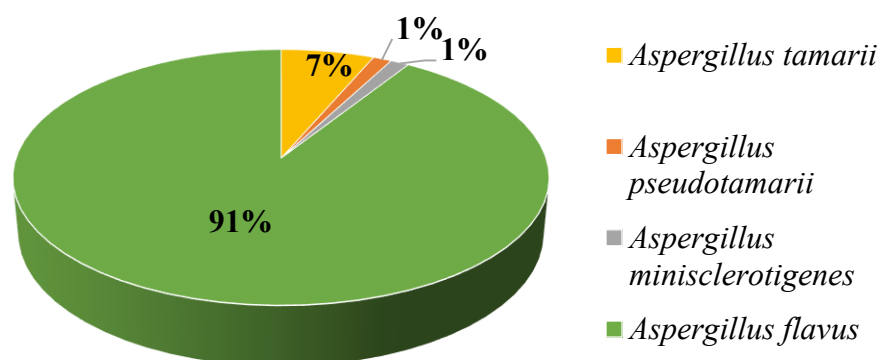
A. flavus kártétele kukoricán (a) és előfordulása búzán (b), konidiumtartókról készült fénymikroszkópos felvétel (c, d).



11. ábra. *Aspergillus nomius* és *A. pseudonomius* (Baranyi és mtsi. 2015a).

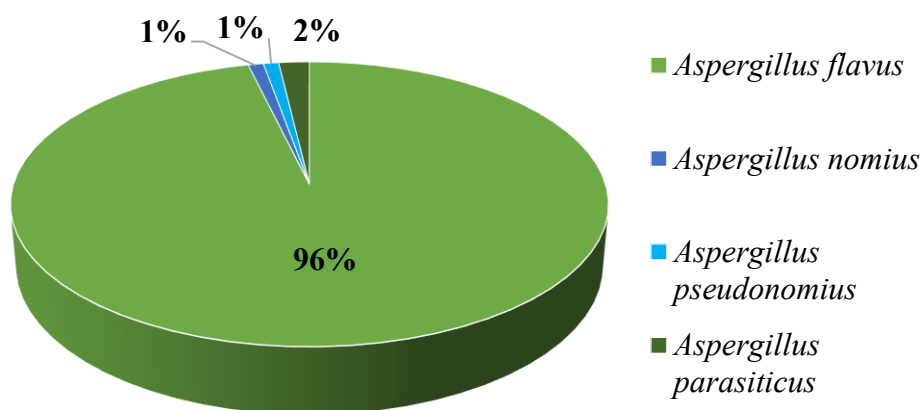
A konídiumtartókról készült fénymikroszkópos felvételek *A. nomius* (a) és *A. pseudonomius* (b) esetében, valamint telepmorfológia PDA táptalajon *A. nomius* (c) és *A. pseudonomius* (d) 7 napos inkubációját követően.

A munkánk során a vizsgált izolátumok közül összesen 193 izolátumot soroltunk az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába, melyek izolálási hely szerinti százalékos eloszlását a 12. és 13. ábrák tartalmazzák.



12. ábra. Az Indiából származó *Aspergillus* izolátumok fajok szerinti százalékos eloszlása.

A Dél-Indiából származó, *Flavi* szekcióba tartozó izolátumok 91%-a az *A. flavus* fajhoz volt sorolható. Az *A. flavus* kozmopolita elterjedésű, a talajban is előforduló faj, mely ezáltal gyakran okoz jelentős károkat különböző termesztett növényeken pl. gabonaféléken, gyapoton, földimogyorón, stb. (Klich 2007a). Dél-Indiában az *Aspergillus* fajok közül az *A. flavus* a keratomikózisok egyik leggyakoribb okozója az *A. niger*, *A. fumigatus* és *A. terreus* mellett. Az *A. tamarii* fajhoz tartozott a vizsgált izolátumok 7%-a, melyek mind klinikai forrásból származtak. Az *A. tamarii* fajt már korábban is összefüggésbe hozták keratomikózis előidézésével Indiában (Kredics és mtsi. 2007). További egy-egy izolátum az *A. minisclerotigenes* és *A. pseudotamarii* fajokhoz tartozott. Az *A. minisclerotigenes*-t földrazi elterjedését tekintve Ausztráliában, Dél-Afrikában és Argentínában is izolálták már környezeti mintákból (Pildain és mtsi. 2008), illetve Iránban humán fertőzést okozó fajként is azonosították (Dehghan és mtsi. 2014). Az *A. pseudotamarii* fajt eddig Japánban, Argentínában és Braziliában azonosították elsősorban környezeti minták vizsgálata során (Ito és mtsi. 2001, Calderari és mtsi. 2013), viszont elsőként mutattuk ki klinikai kórokozóként Indiában (Baranyi és mtsi. 2013a).



13. ábra. Az Európából származó *Aspergillus* izolátumok fajok szerinti százalékos eloszlása.

Az Európából származó izolátumok 96%-a tartozott az *A. flavus* fajhoz. Az *A. flavus* és egyéb potenciálisan aflatoxin-termelő fajok csak az utóbbi évtizedekben jelentek meg Európában (Tirado és mtsi. 2010, Paterson és Lima 2010). Egy-egy *A. nomius* és *A. pseudonomius* izolátumot is azonosítottunk, melyek előfordulásáról eddig elsősorban csak Amerikából számoltak be (Ehrlich és mtsi. 2007, Massi és mtsi. 2014).

6.2. Klinikai izolátumok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata

Az *Aspergillus* nemzetségbe számos opportunista humánpatogén faj tartozik. A nemzetségben belül az egyes fajok igen eltérő érzékenységet mutatnak az egyes gombaellenes szerekkel szemben, ezért különösen fontos a fertőzést okozó faj pontos ismerete. Az elvégzett vizsgálatokkal hangsúlyozni szeretnénk a molekuláris alapon történő fajmeghatározás fontosságát a klinikumban, ugyanis ez a módszer elősegítené az egyes *Aspergillus* fajok által okozott megbetegedések hatékonyabb kezelését. Munkánk során 29 indiai klinikai forrásból származó törzset vizsgáltunk, melyeket Dél-Indiában 2010 és 2011 között gyűjtöttek szaruhártya-gyulladásos esetekből. A vizsgált izolátumok közül 24 az *A. flavus*, 4 az *A. tamarii* és 1 az *A. pseudotamarii* fajba tartozott, referencia törzsként pedig a *Candida albicans* ATCC 90028 jelzésű törzset használtuk. A vizsgálatot E-teszt módszerrel végeztük, amelyet régóta alkalmaznak a patogén fonalgombák gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének megállapítására (Espinell-Ingroff és mtsi. 1997). A módszer előnye a mikrodilúciós meghatározási módszerrel szemben a könnyebb és gyorsabb antifungális érzékenység megállapítása a klinikai vizsgálatok során. A vizsgálat során 3 echinokandint (mikafungin, anidulafungin és kaszopofungin), 4 azolt (itrakonazol, posakonazol, vorikonazol és flukonazol), valamint a polién amfotericin B-t alkalmaztuk. A meghatározott MIC értékeket a 3. táblázat tartalmazza.

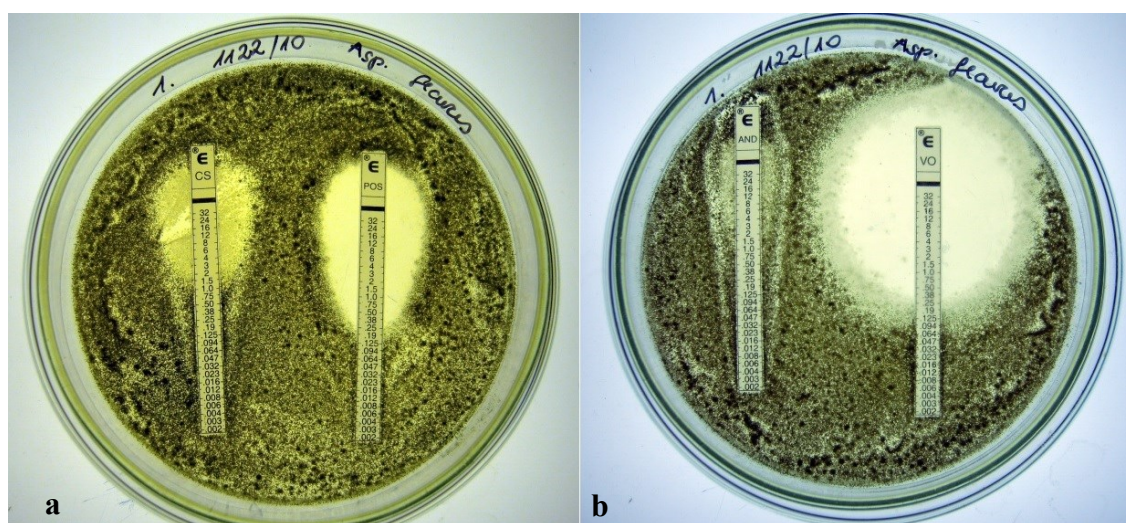
Általánosságban megállapítható, hogy a vizsgált *Aspergillus* fajok csak részben mutatnak érzékenységet az echinokandinokkal szemben standard növekedési tesztek alkalmazása során (Huang és mtsi. 1990). Ezek a szerek ugyanis az *Aspergillus*-ok hifáinak morfológiai változását idézik elő, ezáltal gátolva a növekedést (Kurtz és mtsi. 1994). Ezzel magyarázható, hogy amennyiben az *Aspergillus* fajok echinokandinokkal szemben mutatott érzékenységét vizsgáljuk, nem a klasszikus feltisztulási zónákat tapasztaljuk, mivel a vizsgálat során mikrokolóniák jelennek meg a gátlási zónákon belül (14. ábra). A vizsgált izolátumok közel azonos mértékben voltak érzékenyek a különböző echinokandinokkal szemben, ugyanis mindhárom faj esetében 0,002-0,064 µg/ml értékeknél tapasztaltunk gátlást a mikafungin és az anidulafungin alkalmazásakor.

Az echinokandinok kivételével a gátlási ellipszisek tiszták voltak, viszont formájukban tapasztaltunk eltérést, melyet már korábban is megfigyeltek (Espinell-Ingroff és Rezusta 2002). Az amfotericin B esetében keskeny gátlási ellipszis volt látható. A triazolok közül a vorikonazol esetében volt tapasztalható a legszélesebb gátlási ellipszis (14. ábra).

3. táblázat. Különböző gombaellenes szerek E-teszt módszer segítségével meghatározott MIC értékei *Aspergillus* izolátumok esetében.

		<i>A. pseudotamarii</i> SZMC 3055		<i>A. flavus</i> (24) ^a		<i>A. tamarii</i> (4) ^a	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Anidulafungin (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,002*	4*	0,002-0,008*	1-4*	0,002-0,008*	2-3*
	mértani közép	-	-	0,002	2,5	0,003	3
Mikafungin (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,002*	2*	0,002-0,004*	1,5-8*	0,002-0,016*	1-3*
	mértani közép	-	-	0,002	3	0,009	3
Kaspofungin (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,064*	4*	0,008-0,023*	1-8*	0,016-0,25*	2-6*
	mértani közép	-	-	0,012	2	0,039	6
Amfotericin B (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,19	0,19	0,5-4	2-12	0,064-0,19	0,38-1
	mértani közép	-	-	1,75	4	0,19	0,75
Vorikonazol (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,125	0,19	0,125-0,5	0,19-1	0,064-0,125	0,125-0,19
	mértani közép	-	-	0,25	0,38	0,095	0,15
Posakonazol (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,25	0,25	0,125-0,5	0,19-0,5	0,047-0,064	0,125-0,94
	mértani közép	-	-	0,25	0,38	0,064	0,15
Itrakonazol (0,002-32 µg/ml)	tartomány	0,75	1	0,5-1,5	0,75-2	0,19-0,38	0,38-0,75
	mértani közép	-	-	1	1,5	0,25	0,44
Flukonazol (0,016-256 µg/ml)	tartomány	>256	>256	>256	>256	>256	>256
	mértani közép	>256	>256	>256	>256	>256	>256

A táblázat a két párhuzamos mérés átlagolt MIC értékeit, valamint a mérések mértani középértékeit tartalmazza 24 és 48 óra inkubáció után. ^a Az adott fajba sorolt vizsgált izolátumok számát jelöli. * A leolvasott MIC értékek mellett a gátlási zónán belül mikrokolóniákat tapasztaltunk.



14. ábra. A különböző gátlási ellipszisek 48 óra inkubációt követően.

Az ábrán a kaspofungin és posakonazol (a), illetve az anidulafungin és vorikonazol (b) gátlási zónái láthatók a 1122/10 jelű *A. flavus* izolátum esetében E-teszt alkalmazásakor.

Az amfotericin B-vel szembeni érzékenység vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az *A. flavus* fajhoz tartozó izolátumok MIC értékei 24 óra inkubációt követően 0,5-2 µg/ml között voltak. Az *A. tamaraii* és *A. pseudotamaraii* fajokhoz tartozó izolátumok viszont nagyobb érzékenységet mutattak a szerrel szemben, *A. tamaraii* esetén 0,064-0,19 µg/ml, *A. pseudotamaraii* esetén 0,19 µg/ml koncentrációnál tapasztaltunk gátlást.

Az azolok közül a flukonazol a legmagasabb vizsgált dózis (256 µg/ml) alkalmazása esetén sem váltott ki gátló hatást a vizsgált 29 *Aspergillus* izolátum esetében. Korábbi vizsgálatok során megállapították, hogy míg a legtöbb *Candida* és *Cryptococcus* izolátum érzékeny a flukonazolra, addig az invazív fertőzést okozó penészekkel szembeni alkalmazása hatástalannak bizonyult (Kontoyiannis és Lewis 2002). *A. flavus* esetében a vizsgált triazolok közül a posakonazol és a vorikonazol bizonyult a leghatékonyabbnak, 24 óra tenyésztést követően már 0,125-0,5 µg/ml koncentrációban alkalmazva is gátló hatást fejtettek ki, míg az itraconazol esetében 0,5-1,5 µg/ml MIC értékeket mértünk. Az *A. tamaraii* izolátumok esetében tapasztaltuk a legalacsonyabb MIC értékeket a vizsgált triazolok esetében, az *A. pseudotamaraii* izolátum vizsgálatakor viszont az *A. flavus* izolátumokhoz hasonló MIC értékeket figyeltünk meg (3. táblázat).

Shi és munkatársai (2010) 107 *Aspergillus* izolátum vorikonazollal, posakonazollal, itraconazollal, amfotericin B-vel és kaszpfunginnal szembeni érzékenységét határozták meg E-teszt módszerrel. Az azolokkal szemben a vizsgált 35 *A. flavus* izolátum esetében itraconazol alkalmazása során 0,047-4 µg/ml, vorikonazol esetén 0,095-0,5 µg/ml, míg posakonazol alkalmazásával 0,001-0,75 µg/ml koncentrációknál figyeltek meg gátló hatást. Amfotericin B esetén 1->32 µg/ml, míg kaszpfungin alkalmazásával 0,016-0,19 µg/ml koncentrációknál tapasztaltak gátlást 48 órás inkubációt követően. A Shi és munkatársai (2010) által meghatározott MIC értékeket az általunk kapott MIC értékekkel összevetve megállapítottuk, hogy az azolok vizsgálata során kapott adatok esetében nem volt tapasztalható számottevő különbség. Az amfotericin B MIC értékei a saját izolátumaink esetében alacsonyabbak voltak, vagyis 48 órás inkubációt követően már 2-12 µg/ml koncentrációban alkalmazva gátló hatást fejtettek ki. Különbséget tapasztaltunk a kaszpfungin alkalmazása során is, ugyanis az általunk megállapított MIC értékek 1-8 µg/ml között voltak, amelyek jelentősen magasabbak voltak a korábbi irodalmi adatoknál. Ennek háttérében a gátlási zónán belül megjelenő mikrokolóniák állhatnak, amelyek esetenként zavarhatják a MIC értékek pontos megállapítását.

Kredics és munkatársai (2007) elsőként azonosítottak *A. tamaraii* izolátumot keratitiszből. Az izolátum antifungális szerekekkel szemben mutatott érzékenységét E-teszt és mikrodilúciós módszerekkel állapították meg. Az amfotericin B és itraconazol alkalmazása

során meghatározott MIC értékek alacsonyabbak voltak (0,125 µg/ml amfotericin B esetén és 0,064 µg/ml itrakonazol esetén), míg a vorikonazol esetén megállapított MIC érték (0,125 µg/ml) összhangban volt az általunk vizsgált *A. tamarii* izolátumok MIC értékeivel.

Számos tanulmány foglalkozott a patogén fonalgombák antifungális szerekek szemben mutatott érzékenységének megállapítására szolgáló különböző módszerek összehasonlításával. Messer és munkatársai (2007) a mikrodilúciós növekedési tesztet hasonlították össze korongdiffúziós- és E-teszt módszerekkel. A vizsgálat során 140 klinikai *Aspergillus* (melyből 45 *A. flavus*) és 6 járomspórás gombaizolátum esetében határozták meg posakonazol MIC értékeit. Vizsgálataik alapján megállapították, hogy a referencia CLSI (korábban NCCLS) M38-A mikrodilúciós növekedési teszt alkalmazásával nyert adatok 96,6%-os egyezést mutattak az E-teszt módszerrel nyert adatokkal. Espinel-Ingroff (2001) 186 izolátum (123 *Aspergillus* faj, melyből 16 *A. flavus*) bevonásával határozta meg a MIC értékeket amfotericin B és itrakonazol esetében E-teszt és CLSI M38-P módszerek alkalmazásával. *A. flavus* esetében az amfotericin B MIC értékei 24 óra inkubációt követően 75%-os egyezést mutattak a két módszert összehasonlításakor. Az *A. flavus* izolátumok esetén meghatározott MIC értékek E-teszt módszer alkalmazásával 0,25->8 µg/ml, míg mikrodilúcióval 0,5-4 µg/ml voltak. Az E-teszt és CLSI M38-P módszerek segítségével nyert itrakonazol MIC értékek 24 óra inkubációt követően 100%-os egyezést mutattak, a mért értékek 0,03-0,25 µg/ml voltak. Ezek alapján az általunk vizsgált izolátumok esetében a különböző szerekre kapott MIC értékek elfogadhatónak mondhatók, bár néhány alkalommal eltértek a korábbi irodalmi adatoktól.

6.3. Az izolátumok aflatoxin-termelő képességének vizsgálata

Az aflatoxin-termelés molekuláris úton történő azonosítására vonatkozóan számos kísérletről számol be a szakirodalom. Kezdetben 1-3 gén jelenlétének vizsgálatával próbálták bizonyítani, hogy az adott izolátum rendelkezik-e aflatoxin-termelő képességgel (Shapira és mtsi. 1996), majd a későbbiekben számos, multiplex PCR-alapú módszert teszteltek különböző regulátor- és struktúrgénekre specifikus primerek alkalmazásával (Degola és mtsi. 2007, Levin 2012). Ezenkívül *microarray* alapú technikákat is kifejlesztettek, melyek segítségével sikeresen vizsgálták különböző faktorok aflatoxin-termelésre gyakorolt hatását *A. flavus*-ban (Schmidt-Heydt és mtsi. 2009, Abdel-Hadi és mtsi. 2012).

Fontos megjegyezni, hogy egy faj egyes izolátumai eltérő mértékben képesek aflatoxinokat termelni, illetve egyes izolátumok egyáltalán nem képesek erre, ugyanis a

génklaszter bármelyik génjében történő egyetlen mutáció is az aflatoxin-termelő képesség elvesztését okozhatja (Susca és mtsi. 2014). Emellett a gombák mikotoxin-termelését, így az aflatoxin-termelést is számos külső faktor befolyásolhatja, mint például a fény, pH, vízaktivitás, szénforrás, nitrogénforrás, hőmérséklet (Brakhage 2013).

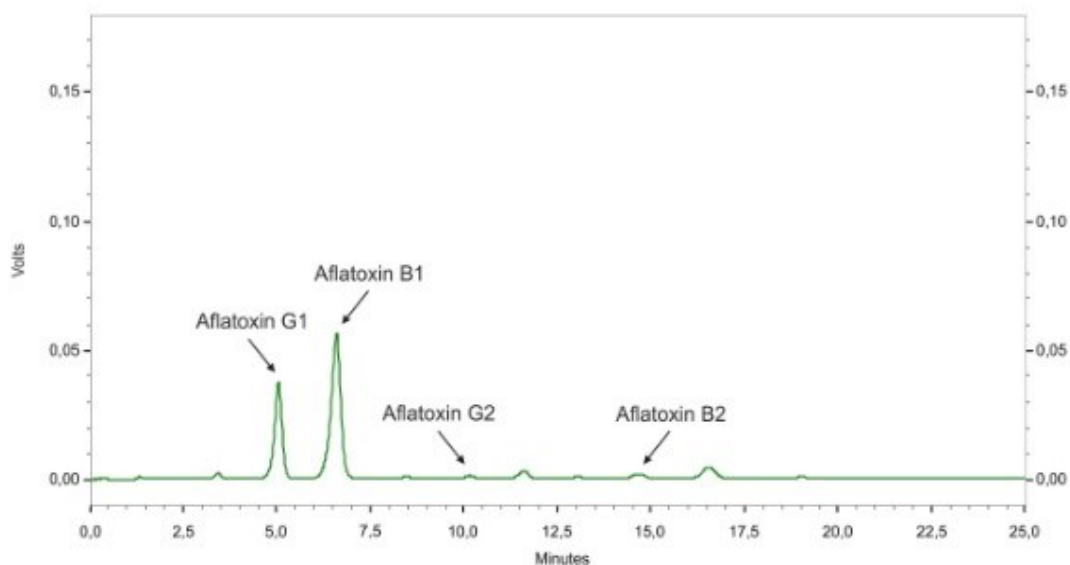
6.3.1. A vizsgált izolátumok aflatoxin-termelő képessége

Vizsgálataink során magas ozmótikus koncentrációjú (YES) tápoldatot és 25 °C-os inkubációs hőmérsékletet alkalmaztunk az izolátumok aflatoxin-termelő képességének megállapítására. A tápoldatból történő kinyerést követően vékonyréteg kromatográfiával (TLC) vizsgáltuk az aflatoxinok jelenlétét, majd szükség esetén HPLC technika segítségével állapítottuk meg a termelt aflatoxinok mennyiségét.

A Dél-Indiából származó klinikai *A. flavus* izolátumok mintegy 47%-a bizonyult aflatoxin-termelőnek. A szekvencia alapú azonosítás által az *A. tamarii* fajba sorolt izolátumok nem rendelkeztek aflatoxin-termelő képességgel. Korábbi publikációkban ugyan beszámoltak aflatoxin-termelő *A. tamarii* izolátumokról (Goto és mtsi. 1996, 1997, Klich és mtsi. 2000), azonban a későbbi vizsgálatok kizárták ennek lehetőségét (Varga és mtsi. 2011). Az *A. pseudotamarii* izolátum viszont, az *A. flavus*-hoz hasonlóan, képes B-típusú aflatoxinokat termelni. A Dél-Indiából származó környezeti izolátumok 50%-a bizonyult aflatoxin-termelőnek.

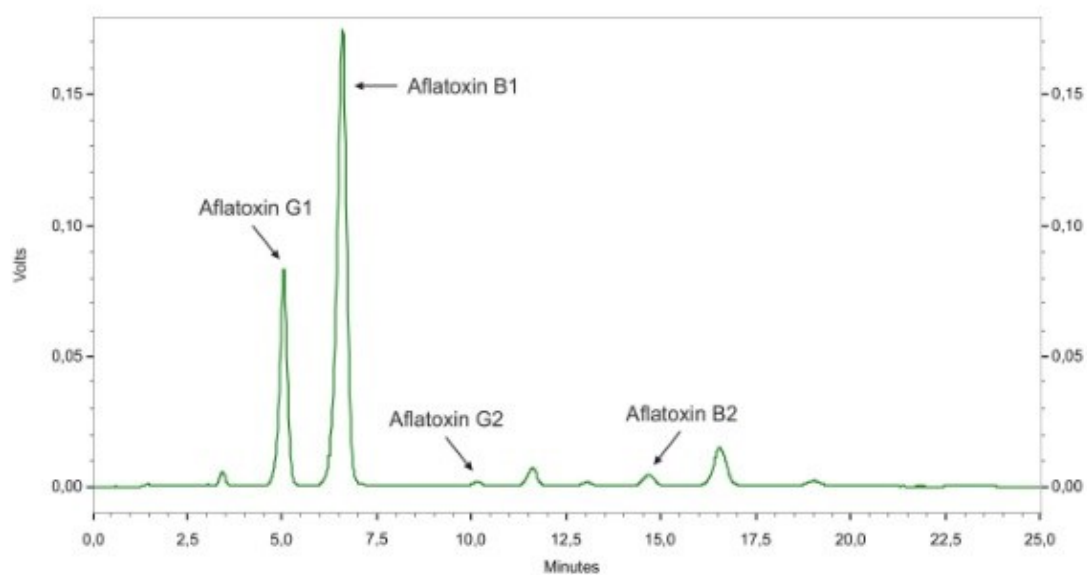
A Horvátországból, beltéri levegőből izolált *A. flavus* izolátumok közül egy sem volt képes aflatoxinokat előállítani. A két azonosított *A. parasiticus* izolátum viszont az alkalmazott inkubációs hőmérséklet és tápközeg függvényében, eltérő arányban és mennyiségben, B- és G-típusú aflatoxinokat is termelt.

A Szerbia északi területeiről származó 25 kukoricáról izolált *A. flavus* törzs közül egyik sem rendelkezett aflatoxin-termelő képességgel. A szintén Szerbia északi területeiről származó kukoricáról izolált *A. pseudonomius* izolátum viszont B-típusú aflatoxinok mellett G-típusú aflatoxinok előállítására is képes volt (15. ábra, Baranyi és mtsi. 2015a). Varga és munkatársai (2011) korábban az USA-ból származó, aflatoxin-termelőként azonosított *A. pseudonomius* törzs (CBS 119388 = NRRL 3353) esetében csak aflatoxin B₁ termelést mutattak ki. Későbbi vizsgálatok azonban tisztázták, hogy az *A. pseudonomius* képes mind B-, mind G-típusú aflatoxinok előállítására (Massi és mtsi. 2014), de az elsőként leírt törzsben valószínűleg sérült az aflatoxin-bioszintézis útvonal.



15. ábra. Az *A. pseudonomius* izolátum által YES tápoldatban 30 °C-on termelt aflatoxinok HPLC kromatogramja.

A Magyarországról, 14 kukoricáról, 21 búzáról, 5 beltéri levegőből és 16 klinikai forrásból származó *A. flavus* izolátumok közül 2 kukoricáról és 1 klinikai forrásból származó izolátum, illetve a sajtmintáról származó *A. nomius* izolátum bizonyult aflatoxin-termelőnek. Az *A. nomius* fajhoz tartozó izolátumok is képesek B- és G-típusú aflatoxinok szintézisére is (16. ábra).



16. ábra. Az *A. nomius* izolátum által YES tápoldatban 30 °C-on termelt aflatoxinok HPLC kromatogramja.

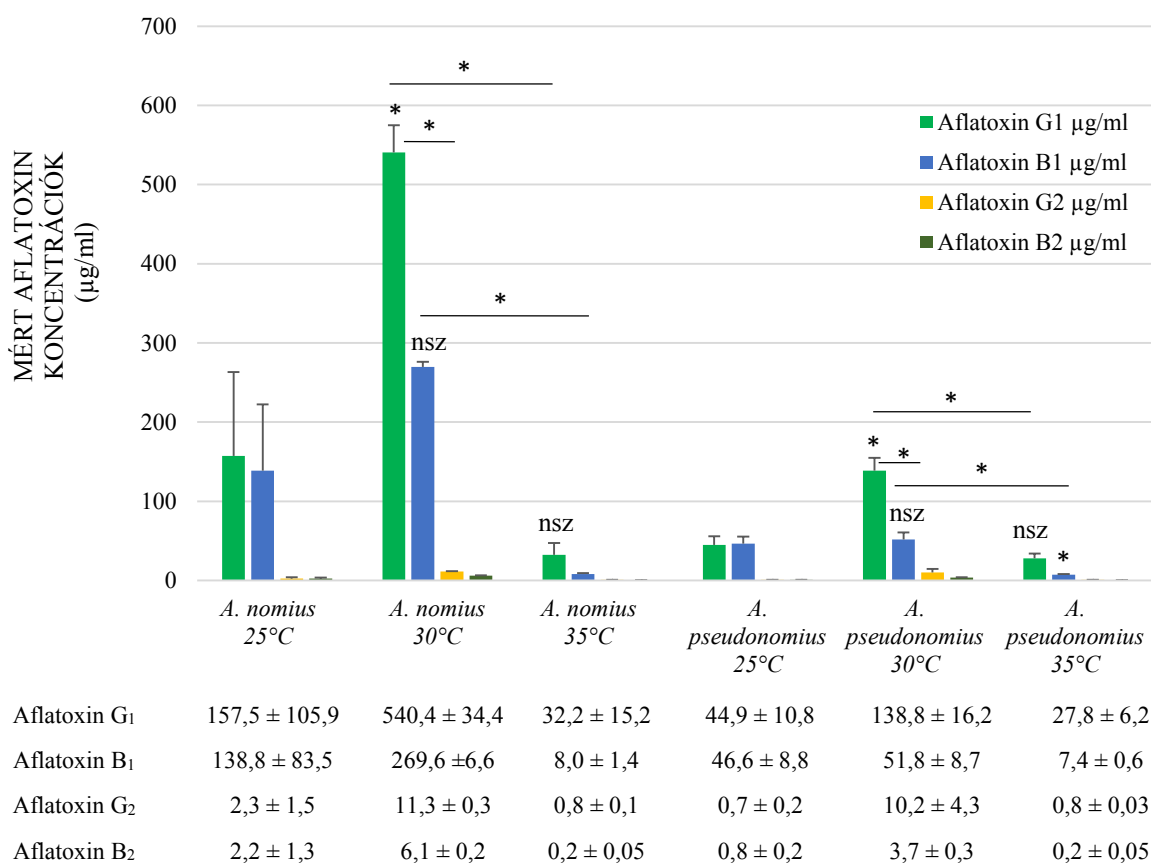
A Dél-Indiából származó klinikai *A. flavus* izolátumok mintegy 47%-a, míg a környezeti izolátumok 50%-a bizonyult aflatoxin-termelőnek, ugyanakkor a magyar, szerb és horvát minták közül csak igen kevés (összesen 3) rendelkezett ezzel a tulajdonsággal. A magyar sajtmintáról származó *A. nomius*, a szerb kukoricáról származó *A. pseudonomius* és a két azonosított *A. parasiticus* izolátum eltérő arányban és mennyiségben termelt B-típusú aflatoxinok mellett G-típusú aflatoxinokat is az alkalmazott inkubációs hőmérséklet és tápközeg függvényében. Munkánk során megállapítottuk, hogy a vizsgálatainkba bevont *A. flavus* törzsek közül elsősorban az Indiából származók voltak képesek aflatoxinokat termelni, míg a magyar, szerb vagy horvát minták közül csak igen kevés rendelkezett ezzel a tulajdonsággal. Ennek háttérében elsősorban az eltérő földrajzi származás és éghajlati tényezők állhatnak.

6.3.2. Aflatoxin-termelés vizsgálata eltérő tenyésztési körülmények mellett

Néhány kiválasztott izolátum esetében vizsgáltuk a különböző tenyésztési körülmények aflatoxin-termelésre gyakorolt hatását. Eltérő inkubációs hőmérsékleteket (25, 30 és 35 °C) és különböző tápközégeket (YES, BHI és RPMI) alkalmaztunk. Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyes izolátumok a különböző *ex vivo* vizsgálatok során alkalmazott BHI és RPMI 1640 tápközégekben képesek-e aflatoxin-termelésre. Ebből következtethetünk arra, hogy egy esetleges humán fertőzés során az adott izolátumok képesek-e aflatoxin-termelésre, ezáltal a beteg további károsítására. Eredményeink azonban csak feltételezések levonására alkalmasak, mivel az alkalmazott tápoldatok nem reprezentálják teljes mértékben az emberi szervezeten belüli körülményeket (pl. sejtekkel történő interakció), mégis fontos információt nyújthatnak a fertőzések során esetlegesen bekövetkező aflatoxin szennyezés kapcsán. A BHI és RPMI 1640 tápközégek alkalmazásával elvégzett kísérletek során az izolátumokat 35 °C-on inkubáltuk.

Korábbi vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az eltérő tenyésztési hőmérsékletek befolyásolják a termelt aflatoxinok mennyiségét és az egyes aflatoxin-típusok arányát is. Ezért megvizsgáltuk a 25, 30 és 35 °C-os inkubációs hőmérsékleten YES tápoldatban termelt aflatoxinok egymáshoz viszonyított arányában esetlegesen bekövetkező változásokat. A vizsgálatokba 3 klinikai forrásból származó *A. flavus*, az előzőekben említett két *A. parasiticus*, valamint az *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. minisclerotigenes* és *A. pseudotamarii* izolátumokat vontuk be. Az alkalmazott hőmérsékletek az *A. flavus* izolátumok aflatoxin-termelését jelentősen nem befolyásolták.

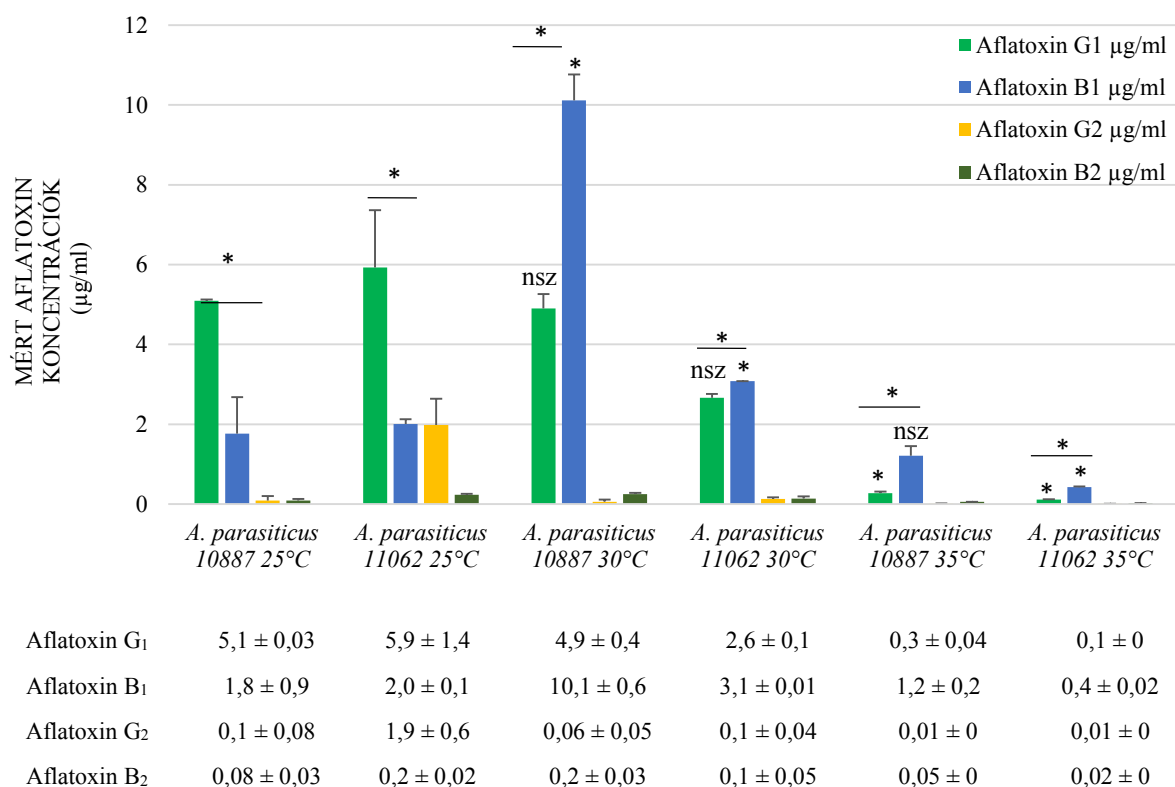
Az *A. nomius* és *A. pseudonomius* izolátumok esetében a 30 °C-os inkubációs hőmérséklet eredményezte a legmagasabb aflatoxin szintet, és mindkét vizsgált izolátum szignifikánsan nagyobb mennyiségben állított elő aflatoxin G₁-et, mint aflatoxin B₁-et. Mindkét törzs esetében azt tapasztaltuk, hogy a 35 °C-on történő tenyésztéskor szignifikáns mértékben csökkent a termelt aflatoxin B₁ és G₁ mennyisége a 30 °C-on mért értékekhez képest (17. ábra).



17. ábra. Az *A. nomius* és *A. pseudonomius* izolátumok általt termelt aflatoxinok mennyisége a hőmérséklet függvényében.

* $p < 0,05$; nsz: nem szignifikáns különbség. A szignifikancia értékeket az adott izolátum esetében az aflatoxin B₁ és G₁ 25°C-on mért értékeihez viszonyítottuk, amennyiben ettől eltérő értékeket hasonlítottunk össze, azt összekötéssel jelöltük.

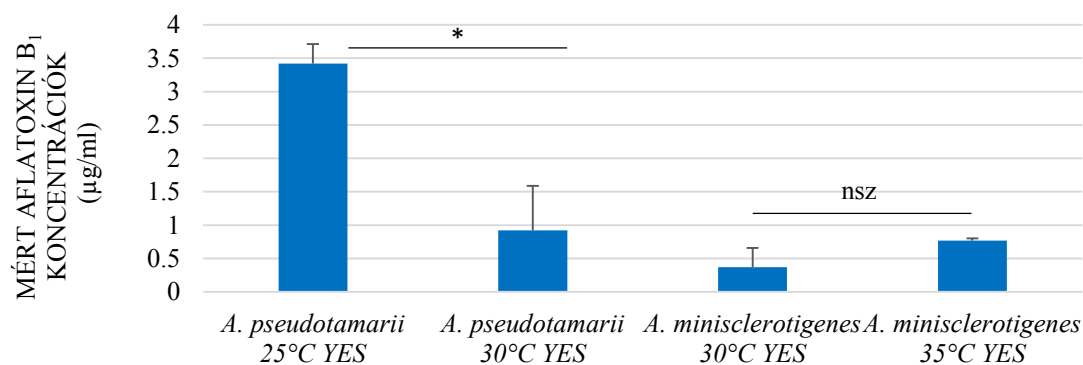
Az *A. parasiticus* izolátumok vizsgálatakor megállapítottuk, hogy 25 °C-os tenyésztési hőmérsékleten legnagyobb mennyiségben aflatoxin G₁-et termeltek, míg a hőmérséklet emelésével az aflatoxinok aránya szignifikánsan megváltozott: a 30 °C-on történő tenyésztés már az aflatoxin B₁ termelésének kedvezett, ez a tendencia a 35 °C-on történő tenyésztés esetében is megfigyelhető volt (18. ábra).



18. ábra. Az *A. parasiticus* izolátumok általt termelt aflatoxinok mennyisége a hőmérséklet függvényében.

* $p < 0,05$; nsz: nem szignifikáns különbség. A szignifikancia értékeket az adott izolátum esetében az aflatoxin B₁ és G₁ 25°C-on mért értékeihez viszonyítottuk, amennyiben ettől eltérő értékeket hasonlítottunk össze, azt összekötéssel jelöltük.

Az *A. pseudotamarii* esetében 25 °C-on, míg az *A. minisclerotigenes* izolátum esetében 35 °C-on mértünk magasabb aflatoxin B₁ szintet (19. ábra). A vizsgált izolátumok többségénél azt tapasztaltuk, hogy az aflatoxin-termelés szempontjából a 35 °C-os inkubációs hőmérséklet bizonyult a legkedvezőtlenebbnek.



19. ábra. Az *A. pseudotamarii* és az *A. minisclerotigenes* izolátumok esetében mért aflatoxin B₁ koncentrációk a hőmérséklet függvényében.

* $p < 0,05$; nsz: nem szignifikáns különbség.

Tervezzük további vizsgálatok elvégzését a hőmérséklet aflatoxin-termelést befolyásoló hatásának vizsgálatára. A vizsgálatok során alkalmazott izolátumok számát is növelni szeretnénk, melyet minden vizsgált faj esetében több, a Szeged Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből származó törzs bevonásával tervezünk megvalósítani. Emellett a jelen vizsgálatok során nyert eredmények tükrében a szórások mértékének csökkentésére több biológiai és technikai párhuzamost is tervezünk alkalmazni. A későbbiekben pedig szeretnénk a különböző hőmérsékleteken az aflatoxin-bioszintézist szabályozó gének expressziójában történő esetleges változásokat nyomon követni különböző molekuláris módszerek alkalmazásával.

Az aflatoxin-termelő gombák elterjedése szempontjából kedvező környezeti feltételek a magas hőmérséklet és páratartalom. Az aflatoxinok termelése szempontjából pedig fontos feltétel a fény hiánya, így a környezetben fellelhető törzsek általában éjszaka termelnek aflatoxinokat. A trópusi és mediterrán területeken éjszaka sem csökken a hőmérséklet 20-25 °C alá, amely szintén kedvezően hat az aflatoxin-termelésre. A mérsékelt éghajlatú területeken is olykor előfordul nyáron, hogy a nappali extrém magas hőmérséklet éjszakára sem csökken 25 °C alá, amely megfelelő körülményeket biztosít ezeken a területen is az aflatoxin-termelésnek. Ezt eredményeink is megerősítik, ugyanis a vizsgált izolátumok 30 °C körüli tenyésztési hőmérsékleten szintetizálták a legnagyobb mennyiségben az aflatoxinokat. A hőmérséklet aflatoxin-termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata és a bioszintézis szabályozás molekuláris hátterének tisztázása nagy jelentőséggel bírhat, ugyanis a mérsékelt égövbe tartozó országokban is egyre gyakrabban okoznak komoly károkat az aflatoxin-termelő gombák.

Korábbi vizsgálatok szerint a meleg és száraz nyár nagymértékben kedvez az *Aspergillus* fajok különböző gabonaféléken (kukorica, búza, rozs, stb.) történő megjelenésének, ezáltal potenciálisan növekedhet a gabonák aflatoxin-szennyezettsége. Romániában az 1997-ben megvizsgált kukoricaminták aflatoxin-mentesek voltak (Curtui és mtsi. 1998), viszont a 2002 és 2004 között gyűjtött kukoricaminták 30%-a már aflatoxin B₁-el volt szennyezett (Tabuc és mtsi. 2009). Ezen minták 20%-ában az Európai Unió határértékeit (5 µg/kg) is meghaladta az aflatoxin-szennyezés. Szerbiában a vizsgált kukoricaminták 18,7%-a bizonyult *A. flavus*-szal fertőzöttnek, és a minták 18,3%-ában aflatoxinokat is kimutattak (Jakić-Dimić és mtsi. 2009). Egy másik felmérésben a vizsgált kukoricaminták 41,2%-ában 2-7 µg/kg közötti aflatoxin szint volt mérhető (Jaksić és mtsi. 2011). Szerbiában, kis tejgazdaságokból gyűjtött tejminták 30,4%-ában az EU-s határértékeket meghaladó aflatoxin M₁-szintet mutattak ki (Polovinski-Horvatić és mtsi. 2009). Kos és munkatársai (2014) Szerbiában 2013-ban 176 különböző típusú tejmintát (kecsketej, szamártej, tehéntej, stb.) vizsgáltak meg.

Megállapították, hogy a tehéntej minták 98,7%-a tartalmazott 0,01-1,2 mg/kg mennyiségben aflatoxin M₁-et, továbbá az ezen minták 86%-ában mért aflatoxin M₁ szint meghaladta az EU által meghatározott 0,05 mg/kg határértéket. A kecsketej-minták 80%-ában, míg a szármáretej-minták 60%-ában is kimutattak aflatoxin M₁-et. Habár 2011-ben Szerbiában is elfogadták az Európai Unió által az aflatoxinok maximálisan megengedett mennyiségére vonatkozó határértékeket, 2013-ban a tejminták nagymértékű aflatoxin M₁-szennyeződését követően ezt a határértéket 0,05 mg/kg-ról 0,5 mg/kg-ra emelték. Szlovéniában a vizsgált tejminták 10%-ában találtak határérték feletti aflatoxin M₁-szintet (Torkar és Vengust 2007). Horvátországban a korábbi vizsgálatok során nem mutattak ki tejben aflatoxin M₁-szennyezést (Haberle 1988), 2010-ben azonban határérték meghaladó aflatoxin M₁-szintet mértek néhány tejmintában (Bilandzić és mtsi. 2010). Pleadin és munkatársai (2014) Horvátország keleti-, közép- és nyugati régióiból, különböző farmokról, illetve tarkarmány készítő üzemekből gyűjtött 633 kukoricaminta vizsgálata esetén a minták 38,1%-ában aflatoxin B₁-et mutattak ki. Olaszországban Anfossi és munkatársai (2012) sajtminták aflatoxin M₁-tartalmát vizsgálták. Megállapították, hogy a vizsgált minták 83%-a ugyan szennyezett volt, de a többségükben mért aflatoxin M₁-szint nem haladta meg a megengedett 0,25 µg/kg limitet.

Az utóbbi években Magyarország különböző részeiről származó kukoricamintákban esetenként igen magas aflatoxin értékeket detektáltak. Dobolyi és munkatársai (2013) Magyarország különböző kukoricatermő régióiból (Dunántúl különböző régiói, Észak- és Dél-Alföld, Észak- és Közép-Magyarország) 2009 és 2010 között gyűjtött kukoricaminták *A. flavus* fertőzöttségét, illetve az izolátumok aflatoxin-termelő képességét vizsgálták. A vizsgált minták 63,5%-a esetén mutattak ki *A. flavus* fertőzöttséget. Az izolátumok aflatoxin-termelését *in vitro* vizsgálattal végezték, vagyis sterilizált kukoricaszemeket oltottak be az izolált *A. flavus* törzsekkel. A vizsgált minták 18,8%-ánál az EU-s határértékeket meghaladó, 5 µg/kg feletti aflatoxin szintet mutattak ki. Tóth és munkatársai (2013) 2010 és 2012 között vizsgálták magyar kukoricaminták gombás fertőzöttségét. Vizsgálataik során megállapították, hogy összességében a *Fusarium* fajok domináltak, ugyanis mindhárom évben a kontaminált minták száma meghaladta a 60%-ot, viszont egyre nagyobb arányban jelentek meg az *Aspergillus* fajok is a *Penicillium* fajok mellett. Eredményeik alapján megállapították, hogy az időjárás nagy szerepet játszik az egyes fajok megjelenésében. 2010-ben a nyár hűvös és csapadékos volt, ekkor a vizsgált kukoricaminták több mint 80%-ában mutattak ki *Fusarium* fajok (*F. graminearum* és *F. subglutinans*) mellett *Penicillium* fajokat is. 2011 és 2012-ben a nyár melegebb és szárazabb volt, ekkor a fertőzött minták esetében a *Fusarium verticillioides* mellett *Aspergillus* fajok is megjelentek. Mi is vizsgáltuk a kukoricaminták toxintartalmát is, 2010-ben

és 2011-ben nem tapasztaltunk aflatoxin-szennyezettséget, viszont 2012-ben néhány vizsgált mintában az EU-s határértékeket is meghaladó aflatoxin kontaminációt detektáltunk (Baranyi és mtsi. 2013c).

Összességében megállapítottuk, hogy a vizsgálatainkba bevont *A. flavus* törzsek közül elsősorban az Indiából származók voltak képesek aflatoxinokat termelni. Ugyanakkor a magyar, szerb vagy horvát minták közül csak igen kevés rendelkezett ezzel a tulajdonsággal. Ennek hátterében elsősorban a földrajzi és éghajlati tényezők állhatnak, ugyanis az indiai klíma kedvezőbb az aflatoxin-termelés szempontjából. Az általunk vizsgált európai izolátumok nem állítottak elő aflatoxinokat, viszont Európa számos országában számoltak már be különböző gabonakészítmények, takarmányok és tejtermékek esetében, olykor az Európai Unió határértékeket meghaladó, aflatoxin-szennyezettségről (Anfossi és mtsi. 2012, Pleadin és mtsi. 2014, Kos és mtsi. 2014, Cano-Sancho és mtsi. 2015). A jelenség hátterében, feltételezések szerint, a globális klímaváltozás állhat, így az egyre melegebb, szárazabb nyarak kedvező feltételeket teremtenek ezeken a területeken is az aflatoxin-termelő fajok elterjedésének.

A vizsgálatainkba bevont európai izolátumok valószínűleg az *A. flavus* populáció azon részéből származtak, amelyek nem képesek aflatoxinokat előállítani. A bizonyítottan aflatoxin-termelésre képtelen *A. flavus* törzseket biokontrollként az aflatoxin kontamináció elleni védekezésben használhatják fel. Ezt a módszert széles körben alkalmazzák pl. kukorica, gyapot vagy földimogyoró esetében (Ehrlich és Cotty 2004, Cotty és Mellon 2006).

Az emberi szervezethez hasonló körülményeket biztosító BHI és RPMI tápközegekben a vizsgált izolátumok nem vagy csak nagyon kis mennyiségben termeltek aflatoxinokat. Az *A. flavus* izolátumok BHI tápközegben egyáltalán nem, míg RPMI tápoldatban 0,008-0,22 µg/ml aflatoxin B₁-et voltak képesek termelni. BHI tápoldatban az *A. pseudotamarii*, az *A. minisclerotigenes*, az *A. nomius*, az *A. pseudonomius* és a két *A. parasiticus* izolátum 0,003-0,17 µg/ml intervallumban termelt aflatoxin B₁-et. A mért aflatoxin B₁ koncentrációk RPMI tápoldatot alkalmazva magasabbak voltak, az egyes izolátumok esetén a 0,02-1,35 µg/ml közötti tartományba estek. Mindkét tápközeg alkalmazása esetén az *A. minisclerotigenes* és az *A. parasiticus* izolátumok a többi vizsgált izolátumhoz képest jóval magasabb koncentrációban termeltek aflatoxin B₁-et. Az izolátumonkénti három biológiai párhuzamos átlagából nyert aflatoxin B₁ koncentrációkat a 4. táblázat tartalmazza a vizsgált fajok esetében.

4. táblázat. *Aspergillus* izolátumok által termelt aflatoxin B₁ koncentrációk BHI és RPMI tápoldatokban.

Vizsgált izolátumok	Aflatoxin B ₁ koncentráció (µg/ml) ± szórás RPMI tápoldat esetén	Aflatoxin B ₁ koncentráció (µg/ml) ± szórás BHI tápoldat esetén
<i>Aspergillus flavus</i>	0,09 ± 0,089	< DL
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,002
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	1,35 ± 0,49	0,15 ± 0,037
<i>Aspergillus nomius</i>	0,06 ± 0,002	0,003 ± 0,0002
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	0,05 ± 0,004	0,01 ± 0,001
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,96 ± 0,27	0,17 ± 0,1

DL: detektálási limit

Vizsgálataink során arra kerestünk válaszokat, hogy egy esetleges humán fertőzés során is képesek-e az általunk vizsgált izolátumok aflatoxin-termelésre. A szakirodalom nem tesz említést arra vonatkozóan, hogy korábban már tapasztalták volna, hogy egy gombás fertőzést követően az adott törzs az emberi testben aflatoxin-termelésre lett volna képes. Klich és munkatársai (2009) összesen 21 klinikai és mezőgazdasági forrásból származó *A. flavus* és *A. nomius* izolátumot vizsgáltak BHI és módosított BHI tápközegekben, melyben különböző glükóz koncentrációkat és különböző pH értékeket állítottak be. A BHI tápközeg 2 g/l glükózt tartalmaz, amely ugyan magasabb, mint a normál vércukorszint értéke, viszont megfelel egy kezeletlen cukorbeteg vércukorszintjének. Mivel korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az aflatoxin-termelést serkenti a magas cukortartalom, illetve az alacsony pH (Klich 2007b), így 3, 4, 7 és 18 g/l cukorral egészítették ki a táptalajokat, valamint a pH-t 7,4-ről 6-ra csökkentették sósav hozzáadásával. Minden általuk vizsgált izolátum 25 °C-on és YES tápközegben tenyésztve aflatoxin-termelőnek bizonyult. Vizsgálataik során megállapították, hogy az alkalmazott törzsek közül csak néhány volt képes módosított BHI táptalajon és 25 °C-on nevelve aflatoxin B₁ termelésére, míg 37 °C-os tenyésztési hőmérséklet mellett egy izolátum sem volt képes aflatoxin B₁ előállítására.

Eredményeink tehát összhangban vannak a korábbi szakirodalmi adatokkal, habár 37 °C helyett 35 °C-os inkubációs hőmérsékletet alkalmaztunk, amely magyarázatot adhat arra, hogy ugyan csak nagyon kis mennyiségben, de az általunk vizsgált *A. parasiticus* és *A. minisclerotigenes* izolátumok képesek voltak BHI tápközegben aflatoxin B₁ előállítására.

6.4. Genetikai variabilitás vizsgálata UP-PCR és mikroszatellit-analízissel

Az *A. flavus* egészségügyi és mezőgazdasági kórokozóként egyaránt gyakori, ezért fontos a különböző *A. flavus* populációk szerkezeti viszonyainak tisztázása, illetve genetikai variabilitásának vizsgálata (Ramírez-Camejo és mtsi. 2012, Hadrich és mtsi. 2013, Mauro és mtsi. 2013, Perrone és mtsi. 2014). Számos molekuláris meghatározási módszer áll rendelkezésünkre, melyek segítségével az *Aspergillus* fajok genotípus változatait azonosíthatjuk (Varga 2006), ezek közé tartozik a random felsokszorozódó polimorf DNS (RAPD), a különböző fragmentum hossz polimorfizmus meghatározási módszerek (AFLP, RFLP), a multilokus enzim elektroforézis (MLEE), az egy nukleotid polimorfizmus vizsgálatok (SNPs) és a mikroszatellit fragmentum hossz polimorfizmus (MLPs).

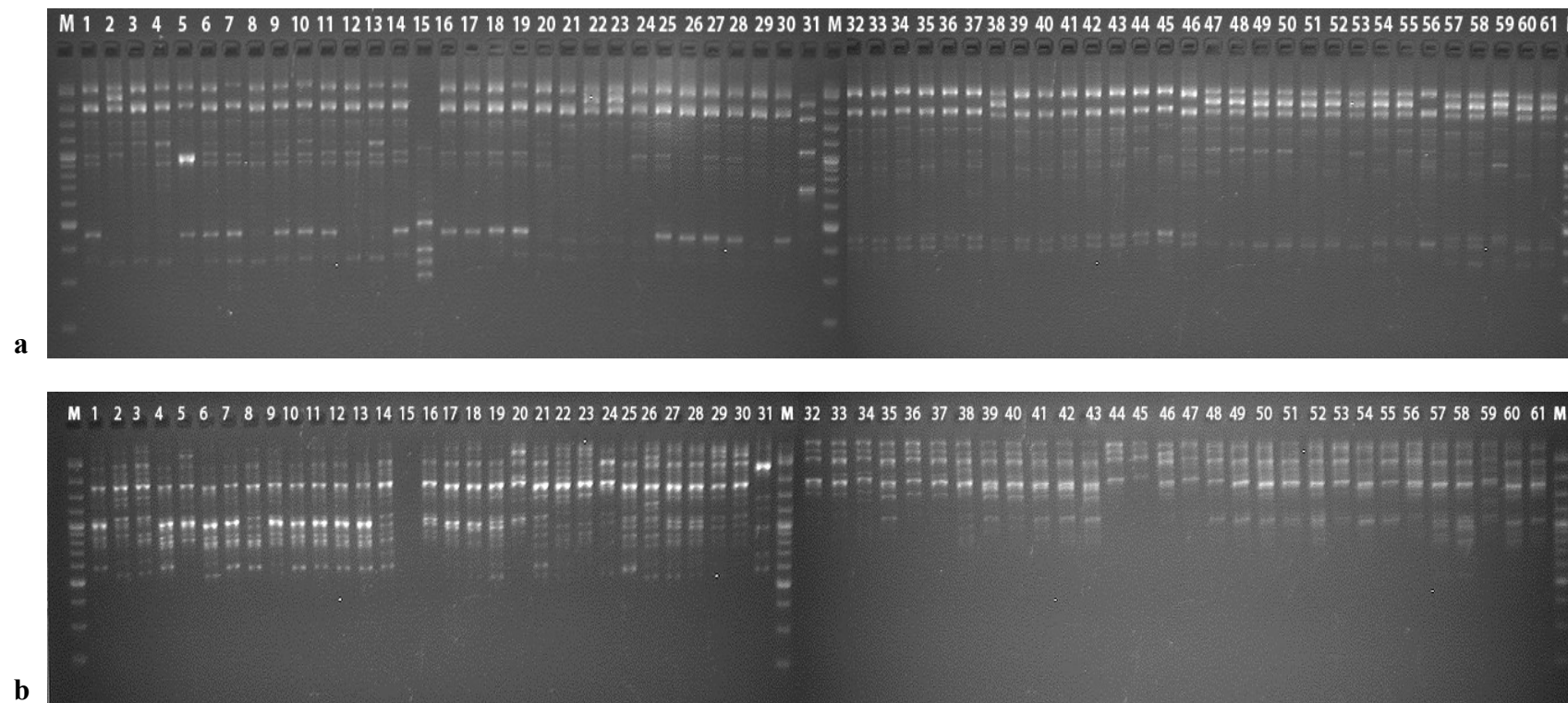
A mikroszatellitek (STR - *short tandem repeat*) olyan rövid ismétlődő szekvenciák, melyek elszórva találhatók meg az eukarióta genomban. Az ismétlődő egységek hossza 2-25 nt között változhat a különböző lokuszokban (van Belkum 1999). A mikrosatellit alapú meghatározást *A. fumigatus* esetében nagy sikerrel alkalmazzák (de Valk és mtsi. 2007, Balajee és mtsi. 2008, Araujo és mtsi. 2009). A módszer a gombagenomban nagy számban fellelhető, meghatározott rövid ismétlődő DNS szakaszok PCR technikával történő felsokszorozásán alapul, majd ezt követi a fragmentumok méretének kapilláris gélelektroforézissel történő meghatározása (Hadrich és mtsi. 2013).

A UP-PCR (*Universally Primed PCR* – univerzálisan bekötődő polimeráz láncreakció) a RAPD módszerhez részben hasonló eljárás, viszont a UP-PCR nagyobb megbízhatósággal alkalmazható a vizsgálatok során (Nielsen és Lübeck 2002). Az előnye a RAPD módszerhez képest a jobb reprodukálhatóság, amely egyrészt a hosszabb (15-23 bp), specifikusan megtervezett indítószekvenciáknak, másrészt a magasabb bekötési hőmérsékletnek (52-65 °C) köszönhető. A UP-PCR primerek tervezésekor két dolgot tartottak szem előtt: egyrészt a tervezett primer bekötési helye a genom egy variábilis intergénikus régiójában legyen, másrészt univerzálisan alkalmazható legyen bármely organizmusra (Nielsen és Lübeck 2002). Mivel a

vizsgálat során nyert fragmentum mintázat minden faj esetén egyedi, így lehetővé válik az egyes fajok elkülönítése, illetve a kisebb különbségekből adódóan egy fajon belül a különböző populációk megkülönböztetésére is alkalmas.

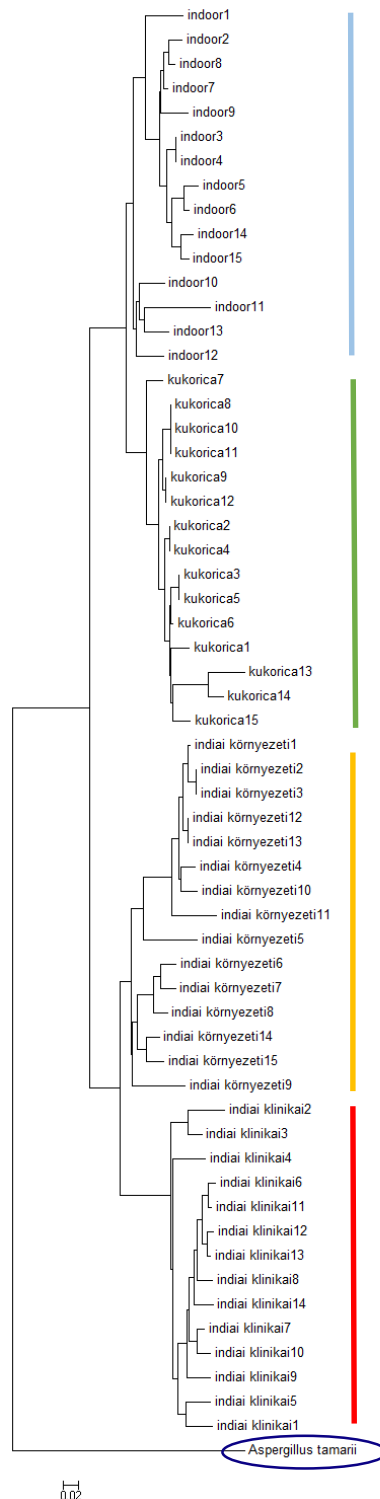
A vizsgálathoz felhasznált törzseket az 1. számú melléklet mutatja be. Az analízisek során összesen 59 *A. flavus* és 1 *A. minisclerotigenes* izolátumot, külsoportként pedig az SZMC 3077 jelű *A. tamaraii* törzset vontuk be a vizsgálatokba. Az *A. flavus* izolátumok különböző földrajzi területekről (Dél-India, Horvátország, Szerbia, Magyarország) és forrásból (klinikai, beltéri levegő, mezőgazdasági) származtak. Mind a négy vizsgált populációból 15-15 izolátumot használtunk fel. A Dél-Indiából származó minták aflatoxin-termelő és nem-termelő izolátumokat is tartalmaztak, míg az Európából származó izolátumok közül egy sem volt képes aflatoxinok előállítására.

Az analízis során 8 primert használtunk, a vizsgálat során nyert adatokat vizuálisan értékeltük ki a gélelektroforetikus mintázatok alapján (20. ábra). A UP-PCR analízis során nyert adatok alapján létrehozott bináris mátrixból a PhylTools program segítségével számoltuk ki a genetikai távolságokat, és a törzsfát a PHYLIP programcsomag 3.67 (Felsenstein 2007) verziójának NEIGHBOR programjával végeztük el (21. ábra).



20. ábra. Az L21 (a) és AS15 (b) primerek alkalmazásával nyert UP-PCR fragmentum mintázatok.

M: Gene Ruler 100 bp Plus molekulásúly marker; 1-15: indiai klinikai izolátumok; 16-30: indiai környezeti izolátumok; 31: *A. tamaris* külcsoport; 32-46: szerb kukoricáról származó izolátumok; 47-61: magyar és horvát beltéri levegőből származó izolátumok fragmentum mintázatai.

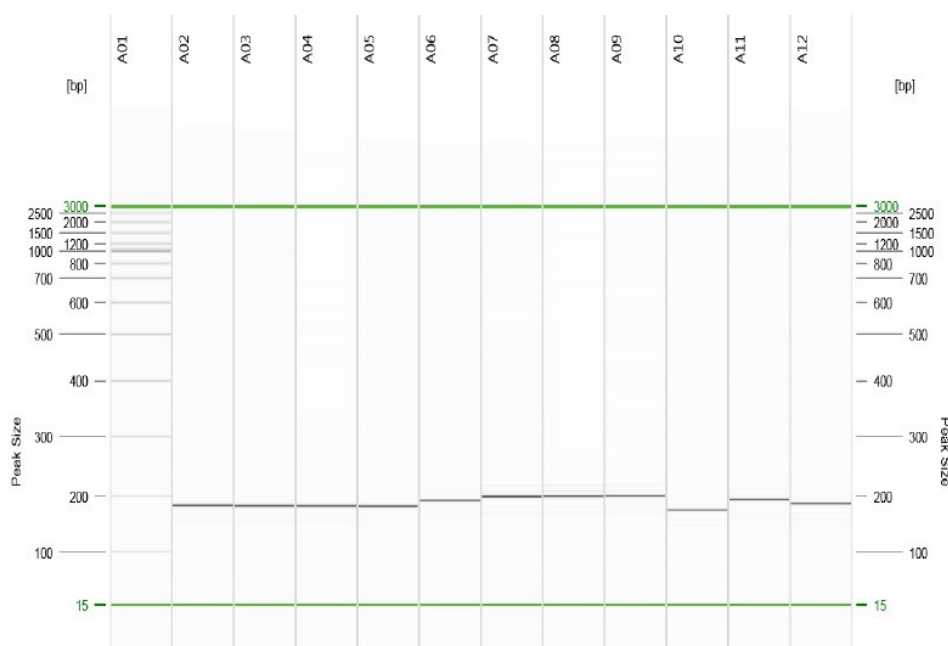


21. ábra. A UP-PCR analízis alapján készített törzsfá.

A törzsfán kézzel jelölve a magyar és horvát beltéri levegőből (indoor), zölddel a szerb kukoricáról, sárgával az indiai környezeti és pirossal az indiai klinikai forrásból származó izolátumokat ábrázoltuk. Az izolátumok pontos törzsgyűjteményi azonosítói az 1. számú mellékletben kerültek feltüntetésre.

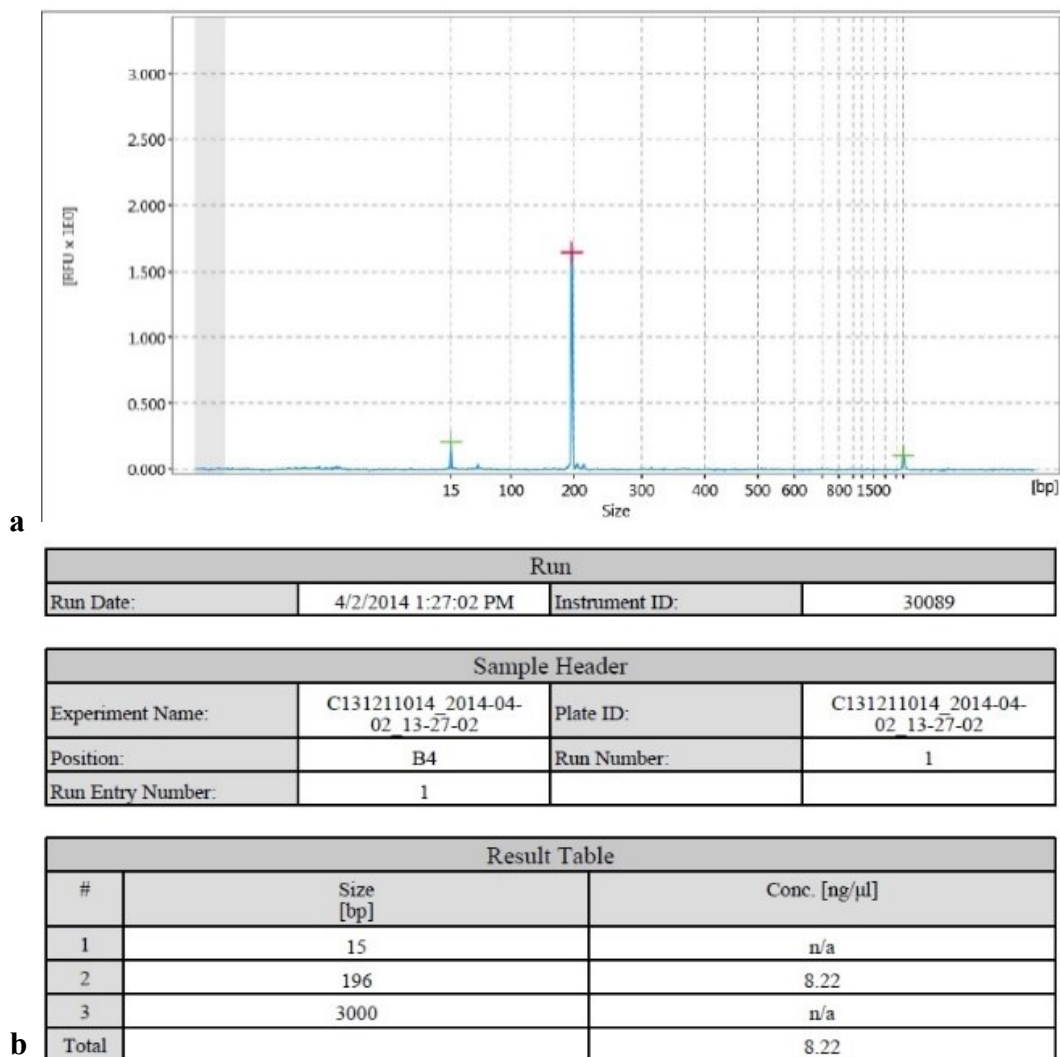
A UP-PCR analízis alapján elkészített törzsfán jól láthatóan külön kládot alkottak az indiai és az európai forrásból származó *A. flavus* izolátumok, valamint mind a négy vizsgált populáció jól elkülöníthető volt egymástól.

A vizsgált populációk közötti genetikai eltérések további vizsgálatára mikroszatellit-analízist alkalmaztunk. A mikroszatellit-analízis során nyert fragmentumok hosszának meghatározását a QIAxcel Advanced System (Qiagen) kapilláris gélelektroforézis készülékkel végeztük (22. ábra), melyeket a QIAxcel - Pure Excellence (Qiagen) programmal értékeltünk ki, így megállapítottuk az egyes fragmentumokhoz tartozó pontos méreteket (23. ábra).



22. ábra. A QIAxcel Advanced System (Qiagen) kapilláris gélelektroforézis készülékkel készített elektroforogram.

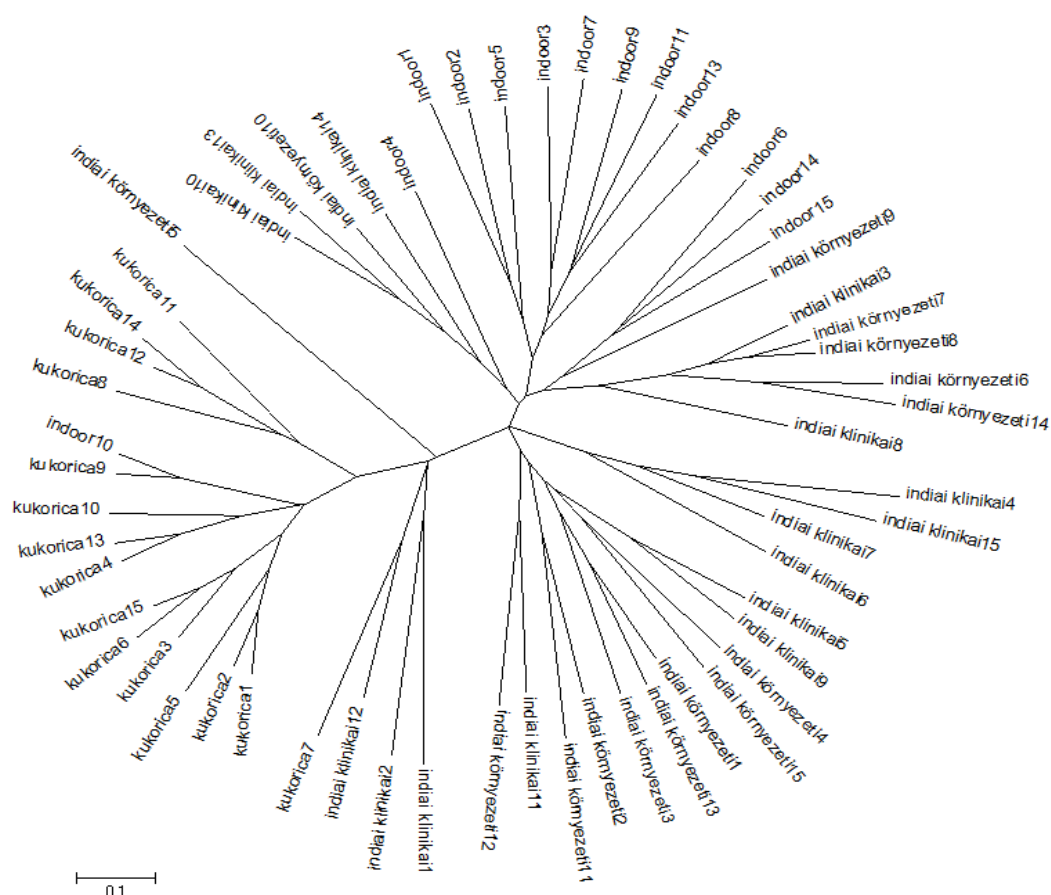
A01: molekulatömeg marker, A02-A12: indiai környezeti minták AFLA3 primer alkalmazásával nyert fragmentum hosszai.



23. ábra. A QIAxcel - Pure Excellence (Qiagen) programmal kiértékelt elektroforogram (a) és a csúshoz tartozó pontos érték (b).

Az ábrán a horvátországi beltéri levegőből származó 11118A XI jelű izolátum AFLA3 primer alkalmazásával kapott fragmentum hossza látható.

A mikroszatellit-analízis során kapott adatokból a genetikai távolságokat a Microsatellite Toolkit program segítségével számoltuk ki, a törzsfa elkészítését a PHYLIP programcsomag 3.67 (Felsenstein, 2007) verziójának NEIGHBOR programjával végeztük (24. ábra). Ebben az esetben, az UP-PCR analízissel ellentétben, nem tapasztaltuk az egyes populációk teljes szeparációját. Néhány szerb kukoricáról, illetve a magyar és horvát beltéri levegőből származó izolátumok különálló kládokat alkottak, viszont az Indiából származó izolátumok egymással keveredve fordultak elő.



24. ábra. A mikroszatellit analízis alapján készített törzsfá.

A törzsfán ábrázolt izolátumok magyar és horvát beltéri levegőből (indoor), szerb kukoricáról, illetve indiai klinikai és környezeti forrásból származtak. Az izolátumok pontos törzsgyűjteményi azonosítói az 1. számú mellékletben kerültek feltüntetésre.

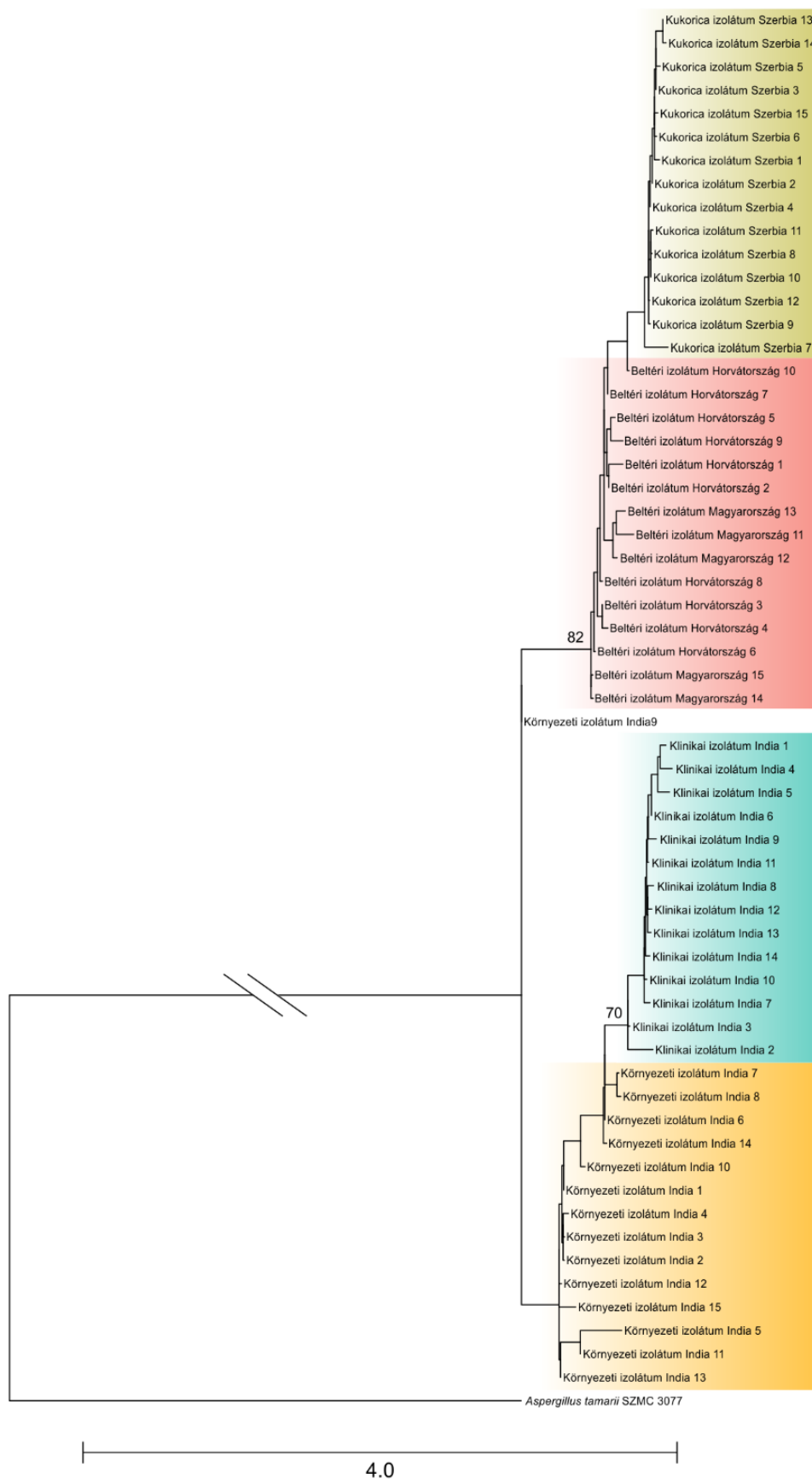
Lübeck és munkatársai (1998) már alkalmazták a UP-PCR technikát *Ascochyta pisi* különböző patotípusainak elkülönítésére. A Nagy-Britanniából és Dániából származó 8 vizsgált izolátum különböző patotípusokba tartozott. Az általuk alkalmazott módszerrel a vizsgált izolátumok földrajzi származás alapján nem, viszont patotípusok alapján elkülönültek. Sweta és munkatársai (2013) RAPD módszerrel 13 primer alkalmazásával Dél-Indiából származó *A. flavus* izolátumok esetében vizsgálták a genetikai variabilitást, illetve minden izolátum esetében meghatározták az aflatoxin-termelő képességet. Munkájuk során nagymértékű genetikai variabilitást állapítottak meg, a vizsgált 11 izolátum négy főbb klaszterbe tömörült és minden klaszter tartalmazott toxin-termelő és nem-termelő izolátumokat is.

A szakirodalmi adatokat saját eredményeinkkel összevetve elmondhatjuk, hogy az általunk készített UP-PCR adatokon alapuló törzsfá egyes kládjain belül mi is az aflatoxin-termelő és nem-termelő izolátumok vegyes előfordulását tapasztaltuk. Viszont a korábbi szakirodalmi adatokkal szemben az általunk vizsgált *A. flavus* populációk földrajzi származás alapján elkülöníthetők voltak.

Hadrich és munkatársai (2013) 7 madarak tüdejéből izolált és 22 a madarak környezetéből származó (pl. tojás, táp) *A. flavus* izolátum jellemzését végezték el mikroszatellit markerek alkalmazásával. Munkájuk során megállapították, hogy a módszer segítségével egyértelműen elkülöníthetők voltak a vizsgált klinikai és környezeti izolátumok. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgált madarak esetében az aszpergillózist kiváltó *A. flavus* izolátumok nagy diverzitást mutathatnak, vagyis nem feltétlenül a közvetlen környezetükből származnak.

Az általunk elvégzett mikroszatellit-analízis során kapott eredményeinket a szakirodalommal összevetve elmondhatjuk, hogy részben ugyan, de megfigyelhető volt az izolálási hely szerinti elkülönülés. Elsősorban az Indiából származó klinikai és környezeti izolátumok nem voltak egyértelműen elkülöníthetők, amely alátámasztja azt a megállapításunkat, miszerint a szemsérülést okozó fertőzött növényi részekről származnak a keratitiszt okozó izolátumok, melyet korábban már Manikandan és munkatársai (2013) is megállapítottak.

Az *A. flavus* faj különböző populációinak genetikai variabilitás vizsgálatát a kalmodulin szekvencia adatok, a UP-PCR analízis és a mikroszatellit-analízis során kapott adatok kombinációjával is elvégeztük. Ezzel a megoldással próbáltuk csökkenteni az egyes módszerek pontatlanságából eredő hibákat. Ennek eredményeként az európai izolátumok (magyar és horvát beltéri levegőből és szerb kukoricáról) magas bootstrap értékekkel különálló kládot hoztak létre. A törzsfán mind a négy populáció jól elkülöníthető volt (25. ábra). Az indiai klinikai és környezeti forrásokból származó izolátumok esetében kapott alacsonyabb támogatottsági értékek szintén a szaruhártya-gyulladást okozó izolátumok és a környezeti izolátumok hasonlóságát mutatják. A törzsfán jól láthatóan elkülönül a Környezeti izolátum 9 (I. coconut 3) jelű törzs, melyet az *A. minisclerotigenes* fajba soroltunk a szekvencia alapú fajmeghatározást követően (Baranyi és mtsi. 2016).



25. ábra. A kalmmodulin, UP-PCR és mikroszatellit adatokon alapuló törzsf.

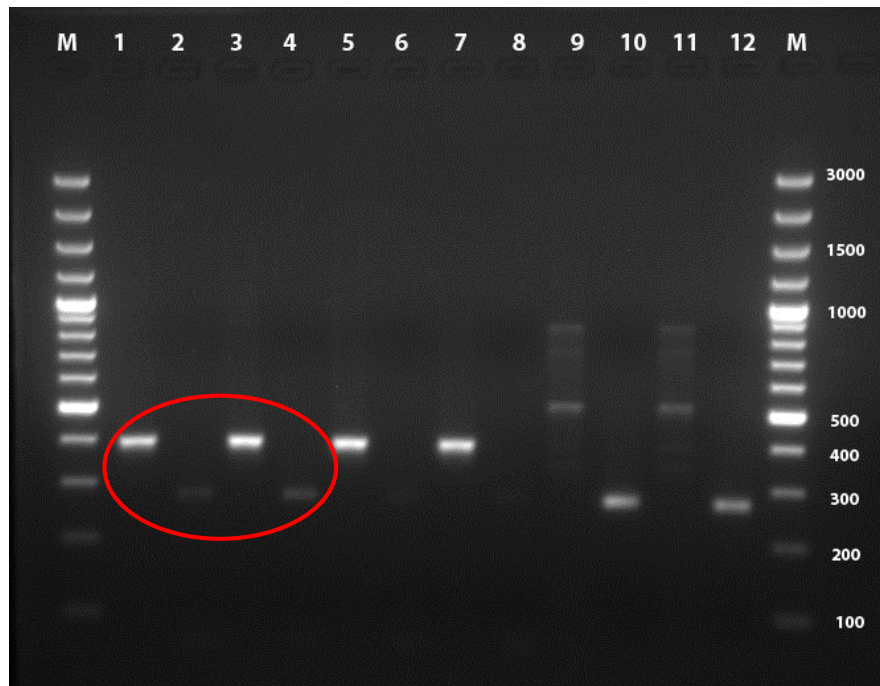
Az izolátumok pontos törzsgyűjteményi azonosítói az 1. számú mellékletben kerültek feltüntetésre.

Az utóbbi években számos tanulmány foglalkozott az *A. flavus* populációk szerkezetének vizsgálatával. Grubisha és Cotty (2010) Arizóna és Texas gyapotültetvényeiről származó, különböző vegetatív kompatibilitási csoportba (VCG) sorolható 243 *A. flavus* izolátum esetében vizsgálták a populációk szerkezetét 24 STR lókusz analízis használatával. Az eredményeik alapján magas szintű genetikai eltérést tapasztaltak az egyes populációk esetében. Ezzel szemben Ramírez-Camejo és munkatársai (2012) a világ számos pontjáról (Puerto Rico, USA, India, Spanyolország, Argentína, stb.) és forrásból (víz, talaj, termékek, klinikai, stb.) származó több mint 200 *A. flavus* izolátumot vizsgáltak AFLP módszerrel. Munkájuk során a különböző földrajzi területekről és forrásból származó minták között kerestek kapcsolatot. A vizsgált vízi- és szárazföldi, vagy a klinikai és környezeti forrásokból származó *A. flavus* populációk viszonyában nem sikerült összefüggést találniuk, eredményeik alapján tehát a vizsgált *A. flavus* izolátumok egy populációt alkottak.

6.5. Párosodási típus gének vizsgálata

Számos bizonyíték áll ma már rendelkezésünkre, mely alátámasztja a szexuális ciklus meglétét a korábban szigorúan aszexuális szaporodásúnak vélt gombák, többek között az *A. flavus*, az *A. parasiticus* és az *A. fumigatus* esetében (Debuchy és Turgeon 2006, Varga és mtsi. 2014). A heterotallikus *A. flavus* jellemzően csak az egyik párosodási típus gént hordozza, így vagy a *MAT1-1*, vagy a *MAT1-2* allél található meg egy-egy izolátumban. A Ramírez-Prado és munkatársai (2008) által a *MAT* gének konzervált régióira tervezett primerekkel mindkét *MAT* idiomorf könnyen azonosítható az *A. flavus* és *A. parasiticus* populációkban.

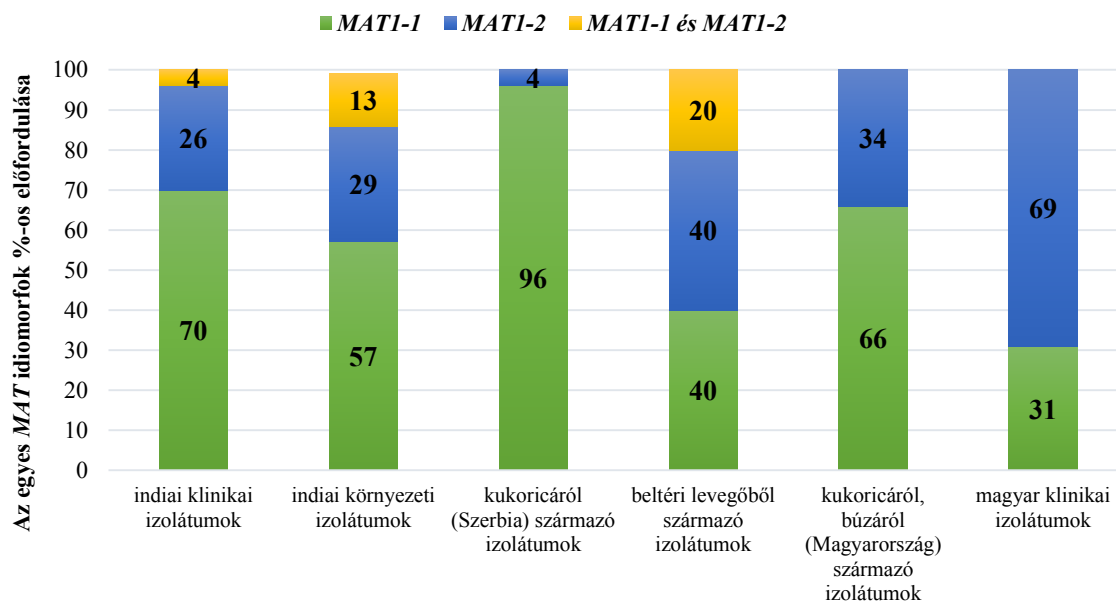
A vizsgálatokhoz alkalmazott specifikus primerpárok a *MAT1-1* allél esetében egy 396 bp méretű, illetve a *MAT1-2* allél esetében egy 270 bp méretű terméket eredményeztek. A PCR reakciót mindkét primerpárral külön-külön és együtt is elvégeztük. A nyert termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el. A vizsgálat során összesen 182 *A. flavus* izolátum esetében határoztuk meg a hordozott *MAT* allélt. A 26. ábrán 6 izolátum párosodási típusának megállapítására szolgáló PCR reakció eredménye került feltüntetésre. Az 1122/10 és 857/10 törzsekben (1-4. minta) mindkét *MAT* allél megtalálható, melyet piros kerettel emeltünk ki az ábrán. Csak a *MAT1-1* allél található meg az ábrán 5-től 8-ig jelölt I. Acacia 2 és K9/2012 törzsekben, míg a 9-től 12-ig jelölt 1257/10 és 802/10 törzsekben csak a *MAT1-2* allél található meg.



26. ábra. MAT allélek azonosítása néhány *A. flavus* izolátum esetében.

M: Gene Ruler 100 bp Plus molekulásúly marker; 1122/10 törzs M1 (1) és M2 (2) primerrel, 857/10 törzs M1 (3) és M2 (4) primerrel, I. Acacia 2 törzs M1 (5) és M2 (6) primerrel, K9/2012 törzs M1 (7) és M2 (8) primerrel, 1257/10 törzs M1 (9) és M2 (10) primerrel, 802/10 törzs M1 (11) és M2 (12) primerrel.

Az indiai keratitiszből származó 70 izolátum esetén 70%-ban regisztráltuk a *MAT1-1*, 26%-ban a *MAT1-2* és 4%-ban mindkét idiomorf jelenlétét. Az indiai környezeti mintákról származó 21 izolátum esetén 57%-ban volt jelen a *MAT1-1*, 29%-ban a *MAT1-2* és 13%-ban mindkét idiomorf. Az európai minták közül a Szerbia északi részéről kukoricáról származó 25 izolátum 96%-a hordozta a *MAT1-1*, míg 4%-a a *MAT1-2* allélt. A beltéri levegőből izolált 15 (10 horvát, 5 magyar) *A. flavus* törzs 40-40%-ban hordozta a *MAT1-1* és *MAT1-2* allélt, és 20%-ban mindkét allélt. A magyar szántóföldi mintákat tekintve (21 búza, 14 kukorica) 66%-ban a *MAT1-1*, míg 34%-ban a *MAT1-2* allél volt jelen. A 16 magyar klinikai forrásból származó *A. flavus* izolátum esetében egyedülként tapasztaltuk a *MAT1-2* allél dominanciáját, ebben az esetben az izolátumok 69%-a hordozta. Ha a közvetlen izolálási helyek szerint felosztva vizsgáljuk az egyes izolátumok MAT eloszlását, a viszonylag kis mintaszám ellenére is jól láthatóan a *MAT1-1* idiomorf volt a domináns, egyedüli kivételt a magyar klinikai forrásból származó izolátumok képeztek (27. ábra).



27. ábra. A különböző izolálási helyekről származó *A. flavus* izolátumok által hordozott MAT allélek százalékos eloszlása.

Korábban, a 2010 és 2011 között izolált 46 indiai klinikai *A. flavus* izolátum által hordozott MAT idiomorf vizsgálata során megállapítottuk, hogy az izolátumok 100%-a a *MATI-1* allélt hordozta (Varga és mtsi. 2014). Ramírez-Camejo és munkatársai (2012) szintén a *MATI-1* idiomorf dominanciáját tapasztalták klinikai minták vizsgálata során, mely alapján arra következtettek, hogy a *MATI-1* jelenléte szerepet játszhat a patogenitásban. Természetes *A. flavus* populációk vizsgálata során Moore és munkatársai (2013) összesen 758 *A. flavus*, *A. parasiticus* és *A. minisclerotigenes* izolátumot vizsgáltak, melyek földimogyoró ültetvényekről származtak az USA-ból, Afrikából, Argentínából, Ausztráliából és Indiából. Munkájuk során megállapították, hogy a genetikai variabilitás és a VCG-kben megfigyelhető diverzitás felelős a szexuális reprodukció meglétéért, valamint a mikotoxin-termelés mennyiségi változatosságáért. A különböző szántóföldi populációk vizsgálatakor arra a következtetésre jutottak, hogy a *MATI-1* és *MATI-2* közel egyenlő aránya összefüggésbe hozható a szexuális szaporodással (Ramírez-Prado és mtsi. 2008, Moore és mtsi. 2009), viszont az aszexuális populációk esetében igen erős eltérést tapasztaltak ettől az aránytól (Paoletti és mtsi. 2005). Az *A. flavus* bizonyos szántóföldi populációi esetében a globális rekombinációs ráta alapján Moore és munkatársai (2009) korrelációt figyeltek meg a párosodási típus gének előfordulása és az aflatoxin-termelő képesség diverzitása között. Az általunk végzett vizsgálatok is

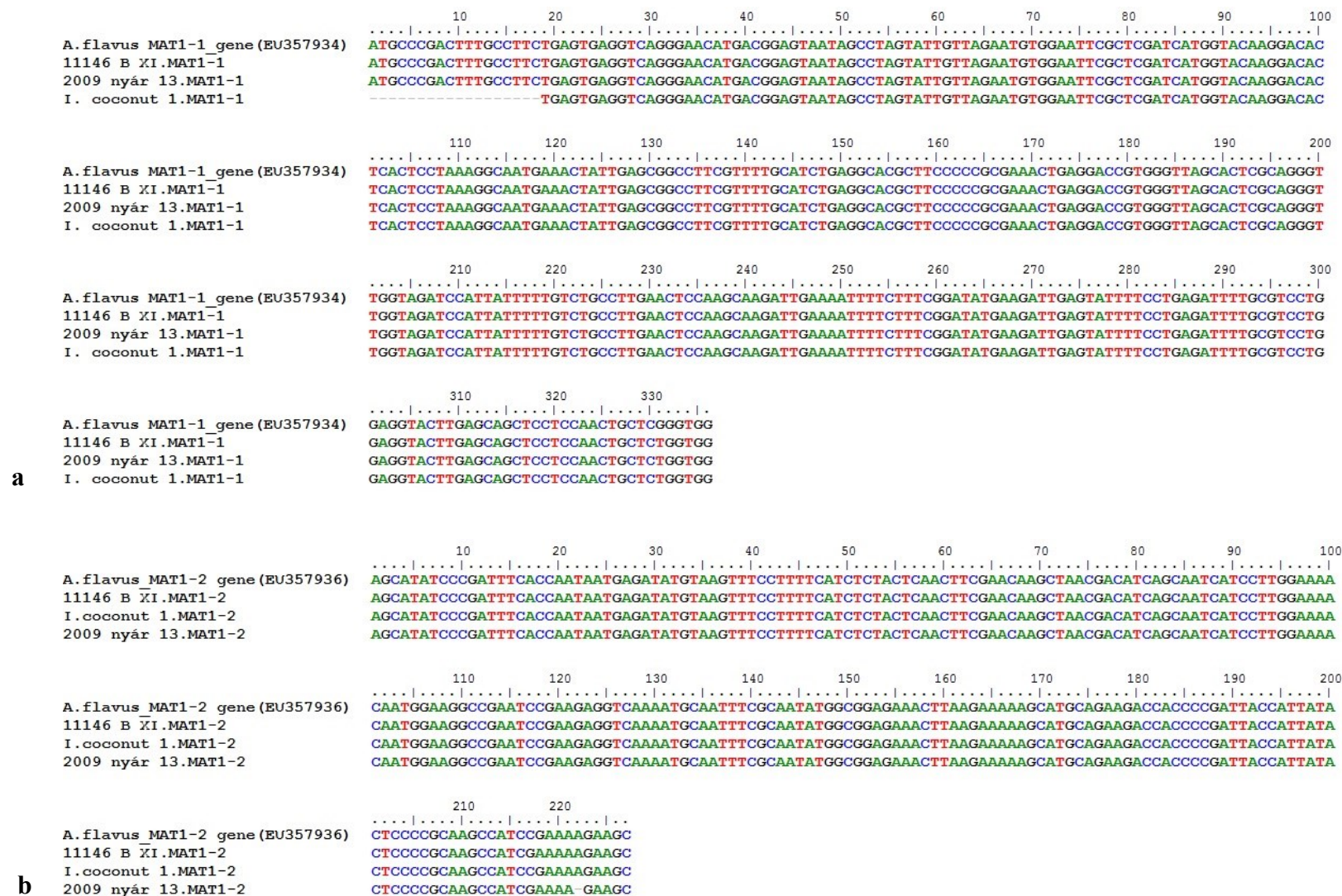
alátámasztották ezt a megfigyelést, ugyanis az aflatoxin-termelő *A. flavus* izolátumok többsége a *MAT1-1* idiomorfot hordozta (5. táblázat).

5. táblázat. Az aflatoxin-termelő képesség és a párosodási típus gének közötti korreláció.

Izolátumok \ Hordozott <i>MAT</i> allél	<i>MAT1-1</i>	<i>MAT1-2</i>	<i>MAT1-1</i> és <i>MAT1-2</i>
<i>Aspergillus flavus</i> AF+ (49 izolátum)	71,5%	24,5%	4%
<i>Aspergillus flavus</i> AF- (133 izolátum)	65%	30%	5%

aflatoxin-termelő törzsek (AF+), aflatoxint nem-termelő törzsek (AF-)

A párosodási típus gének vizsgálata során 9 esetben tapasztaltuk, hogy az adott izolátum mindkét *MAT* allélt hordozta. Ennek tisztázására 3 izolátum esetében a PCR reakció során nyert fragmentumok szekvenciáit meghatároztuk és a GenBank adatbázisban EU357934 és EU357936 azonosító számokon nyilvántartott *A. flavus* *MAT1-1* és *MAT1-2* allélek teljes kódoló régióinak szekvenciáival összevetettük (Ramírez-Prado és mtsi. 2008). Az *A. flavus* *MAT1-1* (EU357934) allélját kódoló régió 1581 bp. Az általunk vizsgált izolátumok esetében a rendelkezésünkre álló primerek alkalmazásával csak egy rövid szakasz (396 bp) összehasonlítására nyílt lehetőségünk, melynek során 100%-os egyezést tapasztaltunk. Az EU357936 azonosító számon nyilvántartott szekvencia 3568 bp hosszú, amely az *A. flavus* *MAT1-2* allél kódoló régióján kívül egy putatív DNS liáz gént kódoló régió részleges szekvenciáit is tartalmazza. Az általunk vizsgált izolátumok esetében a rendelkezésünkre álló M2 primerek alkalmazásával egy 270 bp méretű szakasz összehasonlítására nyílt lehetőségünk, melynek során ebben az esetben is közel 100%-os egyezést tapasztaltunk. Az így kapott illesztéseket a 28. ábra tartalmazza. Minden esetben megállapítottuk, hogy ezen izolátumok valóban hordozzák mindkét allélt. Ezen megfigyelésünk alapján valószínűnek tartjuk a heterokariózis előfordulását a vizsgált *A. flavus* izolátumok esetében (Baranyi és mtsi. 2016).



28. ábra. Az *A. flavus* MAT1-1 gén (EU 357934) (a) és MAT1-2 gén (EU 357936) (b) részleges szakaszaival illesztett szekvenciák.

Az általunk vizsgált izolátumok *MAT* lókuszában megfigyelt heterokariózis további vizsgálatok alapjául szolgálhat. Terveink közt szerepel szexuálisan kompatibilis *A. flavus* törzsek keresztezése és az esetleges feno-, illetve genotípusban bekövetkező változások monitorozása.

Kilenc szexuálisan kompatibilis *A. flavus* törzs keresztezésének vizsgálatakor elsőként Olarte és munkatársai (2012) találtak közvetlen genetikai bizonyítékot arra, hogy az *A. flavus* esetében szexuális rekombináció történik meiózis során. Továbbá azt is megállapították, hogy az átkereszteződések befolyásolhatják az *A. flavus* törzsek toxin-termelő fenotípusát. Egyes esetekben a vizsgált izolátumok teljesen elvesztették az aflatoxin-termelő képességüket egy nonszensz mutáció következtében, vagy amennyiben az átkereszteződések következtében nem veszett el teljesen a toxicitás, akkor is szignifikánsan csökkent az aflatoxin termelésük. A keresztezésekből származó utódok közül legalább egy esetben a *MAT* lókuszon belül is heterokariózist figyeltek meg.

Az *A. flavus* esetében megfigyelt heterokariózis, illetve a szexuális rekombinációt követő változások az aflatoxin-bioszintézisben nagy hatással lehetnek a biokontrollként korábban már hatékonyan alkalmazott aflatoxint nem-termelő törzsek környezetben való alkalmazására. A biokontroll törzsek esetében tapasztalt nagy populációdensitás a szexuális szaporodás gyakoriságának növekedéséhez vezethet (Olarte és mtsi. 2012). Továbbá a szexuális szaporodás esetében az átkereszteződések, illetve a független szegregáció következtében az egyes utódok könnyen elveszíthetik, vagy éppen szert tehetnek aflatoxin-, illetve egyéb toxin-termelő képességre. Ezáltal a szexuális szaporodás szerepet játszhat abban, hogy azokon a területeken is megjelenhetnek aflatoxinok-termelő izolátumok, ahol tartósan biokontroll törzseket alkalmaznak (Cotty 1994, Dorner és mtsi. 1999).

A természetben előforduló *A. flavus* populációk az aflatoxin-termelést tekintve jelentős különbségeket mutatnak, melyek a környezeti feltételeknek, az aflatoxin-bioszintézis útvonal szabályozásában történő különbségeknek, illetve az aflatoxin génklaszterben történő delécióknak vagy funkcióvesztéses mutációknak tulajdonítható. Ezért nagy jelentőséggel bír azon evolúciós folyamatok vizsgálata és megértése, amelyek az *A. flavus* izolátumok fajon belüli genetikai diverzitását okozzák. Továbbá magyarázatot kaphatunk az aflatoxigenitásban tapasztalható mennyiségi különbségekre is, ugyanis számos populációgenetikai vizsgálat alapján bizonyítékot találtak kifejezetten az aflatoxin-bioszintézis génklasztert érintő rekombinációra.

Munkánk során megerősítést kaptunk arra, hogy Európában is számolnunk kell különböző mezőgazdasági termények és élelmiszeripari termékek aflatoxin-szennyezettségével. A vizsgálataink során kapott eredmények alapját képezhetik az aflatoxin-termelő *Aspergillus* fajok elleni védekezésre irányuló kutatásoknak is.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának tagjai mind mezőgazdasági, mind pedig klinikai szempontból igen fontosnak tekinthetők. Napjainkban az *Aspergillus* fajok egyre gyakrabban okoznak mikózisokat legyengült immunrendszerű betegekben. Az *A. flavus* az invazív aszpergillózisok második leggyakoribb előidézője az *A. fumigatus* után, továbbá gyakran okoz felületi fertőzéseket. Az *Aspergillus* fajok az egyik legelterjedtebb előidézői a gombák által okozott keratitisznek szubtrópusi, illetve trópusi területeken. Az *A. flavus* ezenkívül jelentős mezőgazdasági kártevő, mely súlyos hozamvesztéseket okoz világszerte, továbbá az egyik legfontosabb aflatoxin-termelő faj. Az aflatoxinok az egyik legjelentősebb mikotoxin-csoport egyike, melyek szintézisére az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó fajok közül közel 20 képes. A globális klímaváltozás hatásaként várhatóan egyre inkább elterjednek az aflatoxin-termelő gombák azon mérsékelt éghajlattal rendelkező országokban is, ahol előfordulásuk korábban nem volt jellemző. Ezért vizsgálataink különböző területekről származó, elsősorban *A. flavus* izolátumok jellemzésére és genetikai variabilitásának vizsgálatára irányultak.

Munkánk során 194 Dél-Indiából, Magyarországról, Horvátországból, valamint Szerbiából származó, morfológiai vizsgálatok alapján az *A. flavus* fajhoz sorolt izolátumok kalmodulin szekvencián alapuló fajmeghatározását végeztük el. A fajazonosítást követően 193 izolátumot soroltunk az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába, melyek közül 182 izolátum tartozott az *A. flavus*, 5 az *A. tamarii*, 1 pedig az *A. pseudotamarii* fajokba, míg 1 izolátumot *A. terreus*-ként azonosítottunk, ami az *Aspergillus* nemzetség *Terrei* szekciójába tartozik. Az *A. pseudotamarii*-t elsőként azonosítottuk mint humán keratitist előidéző fajt (Baranyi és mtsi. 2013a). Az *A. pseudotamarii* az *A. flavus*-hoz hasonlóan csak B-típusú aflatoxinok előállítására volt képes. Egy dél-indiai fertőzött kókuszdióról azonosított izolátumot az *A. minisclerotigenes* fajba soroltunk, amely B- és G-típusú aflatoxinok előállítására is képes volt. Az *A. flavus* izolátumok mellett horvát beltéri levegőből 2 *A. parasiticus* izolátumot, magyar sajtmintről 1 *A. nomius*, míg szerb kukoricaszemekről 1 *A. pseudonomius* izolátumot azonosítottunk. Ezen izolátumok szintén képesek voltak a B-típusú aflatoxinok mellett G-típusú aflatoxinok előállítására is. Fontos megjegyezni, hogy az *A. nomius* és *A. pseudonomius* fajok közép-európai előfordulását elsőként írtuk le (Baranyi és mtsi. 2015a).

Az *Aspergillus* nemzetségbe számos opportunistá humánpatogén faj is tartozik, melyek a különböző klinikumban alkalmazott gombaellenes szerekre nézve rendkívül eltérő

érzékenységet mutathatnak. Munkánk során a gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatát a mikrodilúciós módszer egyik alternatívájaként alkalmazható módszer, az E-teszt segítségével végeztük el 29 indiai klinikai forrásból származó törzs bevonásával. A vizsgált izolátumok között 24 *A. flavus*, 4 *A. tamarii* és 1 *A. pseudotamarii* szerepelt. A vizsgálat során 3 echinokandit (mikafungin, anidulafungin és kaszopofungin), 4 azolt (itrakonazol, posakonazol, vorikonazol és flukonazol), valamint a polién amfotericin B-t alkalmaztuk. A vizsgált izolátumok közel azonos mértékben voltak érzékenyek a különböző echinokandinokkal szemben, habár minden esetben mikrokolóniák jelentek meg a gátlási zónákon belül. Az amfotericin B-vel szembeni érzékenység vizsgálatakor megállapítottuk, hogy az *A. tamarii* és az *A. pseudotamarii* izolátumok nagyobb érzékenységet mutattak az *A. flavus* fajba sorolt izolátumokkal szemben. Az azolok közül a flukonazol hatástalannak bizonyult a vizsgált törzsekre. A triazolokkal szembeni érzékenységi vizsgálatok során az *A. tamarii* izolátumok esetében tapasztaltuk a legalacsonyabb MIC értékeket, míg az *A. pseudotamarii* és az *A. flavus* izolátumok esetében közel azonos MIC értékeket határoztunk meg, melyek esetében a posakonazol és a vorikonazol bizonyultak a leghatékonyabbnak. Eredményeinket szakirodalmi adatokkal összevetve megállapítottuk, hogy az E-teszt módszer megfelelő segítség lehet a klinikumban a hatékony gombaellenes terápia kiválasztásában.

Az izolátumok aflatoxin-termelő képességének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a Dél-Indiából származó klinikai *A. flavus* izolátumok mintegy 47%-a, míg a környezeti izolátumok 50%-a bizonyult aflatoxin-termelőnek, ugyanakkor a magyar, szerb és horvát minták közül csak igen kevés (összesen 3) rendelkezett ezzel a tulajdonsággal. A magyar sajtmintáról származó *A. nomius*, a szerb kukoricáról származó *A. pseudonomius* és a két azonosított *A. parasiticus* izolátum eltérő arányban és mennyiségben termelt B-típusú aflatoxinok mellett G-típusú aflatoxinokat is az alkalmazott inkubációs hőmérséklet és tápközeg függvényében. Munkánk során megállapítottuk, hogy a vizsgálatainkba bevont *A. flavus* törzsek közül elsősorban az Indiából származók képesek aflatoxinokat termelni, míg a magyar, szerb vagy horvát minták közül csak igen kevés rendelkezett ezzel a tulajdonsággal. Ennek hátterében elsősorban az eltérő földrajzi származás és éghajlati tényezők állhatnak. Habár az általunk vizsgált európai izolátumok nem állítottak elő aflatoxinokat, Európa számos országában már olykor az Európai Unió határértékeit meghaladó aflatoxin-szennyezettségről is beszámoltak különböző gabonafélékben és tejtermékekben. Az aflatoxin-termelő képességben tapasztalt különbségek hátterében az állhat, hogy a vizsgálatainkba bevont európai izolátumok valószínűleg az *A. flavus* populáció azon részéből származtak, amelyek valamilyen

nonszensz mutáció következtében nem képesek aflatoxinokat előállítani. Ezért további vizsgálatokat tervezünk Európából és különösen Magyarországról, gabonafélékről származó *A. flavus* izolátumok bevonásával az aflatoxin-termelő képesség háttérének tisztázására.

Néhány izolátum esetén vizsgáltuk a különböző tenyésztési körülmények aflatoxin-termelésre gyakorolt hatását. A YES tápoldat esetén eltérő inkubációs hőmérsékleteket (25, 30 és 35 °C), valamint 35 °C-os inkubációs hőmérséklet mellett az emberi szervezethez hasonló körülményeket imitáló tápközegeket (BHI és RPMI) alkalmaztunk. A vizsgálatokba 3 klinikai forrásból származó *A. flavus*, két *A. parasiticus* és egy-egy *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. minisclerotigenes* és *A. pseudotamarii* izolátumot vontunk be. Összességében megállapítottuk, hogy az *A. parasiticus* esetében 25 °C-on, míg a többi vizsgált izolátum esetében 30 °C-os inkubációs hőmérsékleten mértük a legmagasabb aflatoxin mennyiséget. Az emberi szervezethez hasonló körülmények vizsgálatára használt BHI és RPMI tápközegekben a vizsgált izolátumok többsége nem vagy csak nagyon kis mennyiségben termelt aflatoxinokat, kivételt csak az *A. parasiticus* és *A. minisclerotigenes* izolátumok képeztek.

A genetikai variabilitás vizsgálatához az alkalmazott UP-PCR analízis és a mikroszatellit-analízis során nyert adatokat külön-külön és együtt is vizsgáltuk. A mikroszatellit analízis során nyert adatok filogenetikai vizsgálatát követően nem tapasztaltuk az egyes populációk teljes szeparációját. Azonban a szerb kukoricáról, illetve a magyar és horvát beltéri levegőből származó izolátumok bizonyos tagjai különálló kládot alkottak, viszont az Indiából származó izolátumok egymással keveredve fordultak elő. A UP-PCR analízis során nyert adatok filogenetikai vizsgálatát követően már az egyes populációk földrajzi származás szerinti szeparációját figyeltük meg. A genetikai variabilitás további vizsgálatához a kalmodulin szekvencia adatokat, emellett a UP-PCR analízis és a mikroszatellit-analízis során nyert adatokat együtt vizsgáltuk. A filogenetikai analízis alapján a magyar és horvát beltéri levegőből és a szerb kukoricáról származó izolátumok magas bootstrap értékekkel különültek el az Indiából, klinikai és környezeti forrásból származó izolátumoktól. Habár az indiai izolátumoknál alacsony támogatottsági értékeket kaptunk, a törzsfán mind a négy populáció jól elkülönülő kládokat alkotott.

A korábban kizárólag ivartalanul szaporodónak vélt *A. flavus* esetében is bebizonyították, hogy képes ivaros szaporodásra is, ezért meghatároztuk a vizsgálatainkba bevont *A. flavus* izolátumok által hordozott párosodási típus (*MAT*) géneket is specifikus primer párok alkalmazásával. A *MAT1-1* esetén egy 396 bp méretű szakaszt, míg a *MAT1-2* allél esetén

egy 270 bp méretű szakaszt szaporítottunk fel, melyek méretükben megegyeztek a szakirodalmi adatokkal. A vizsgált izolátumokat a közvetlen izolálási helyek szerint csoportosítva a *MAT1-I* allél jelenléte volt a domináns minden csoportban, egyedüli kivételt a magyar klinikai forrásból származó izolátumok képeztek. A vizsgálat során 9 esetben azt tapasztaltuk, hogy az adott izolátum mindkét *MAT* allélt hordozta, amely az *A. flavus* izolátumok keresztezésekor már korábban is tapasztalt heterokariózis meglétét támasztja alá.

8. SUMMARY

Members of *Aspergillus* section *Flavi* have both clinical and agricultural importance. The significance of infections caused by *Aspergillus* species has increased in recent years among immunocompromised patients. In tropical and subtropical developing countries *Aspergilli* are the second most common cause of mycotic keratitis. *Aspergillus flavus* is the second most important causative agent of invasive aspergillosis after *A. fumigatus*, and frequently causes cutaneous and wound aspergillosis. Besides, *A. flavus* is a widespread pathogen of various economically important crops including maize, cotton and peanut, and causes serious yield losses throughout the world. In addition, it is one of the major species of the *Aspergillus* genus able to produce mycotoxins such as aflatoxins, which are produced by at least 20 species of the genus *Aspergillus*. Climate changes and global warming may lead to the occurrence of aflatoxin producing fungi in countries with temperate climate. Due to their great influence in health and agriculture, we identified and examined the genetic variability of potential aflatoxin producers (mainly *A. flavus* isolates) from different habitats using various techniques.

Our objectives were the following:

- Collection of *Aspergillus* species with potential aflatoxin producing ability and genotypic analysis of the isolates based on a part of the calmodulin gene.
- Testing the aflatoxin producing ability of the isolates.
- Examination of antifungal susceptibility in clinical isolates.
- Investigation of the genetic variability of *A. flavus* isolates from different habitats using UP-PCR and microsatellite typing methods.
- Examination of the mating-type locus genes.

In this study, we have investigated 194 isolates deriving from South India, Croatia, Serbia, and Hungary which were identified as *A. flavus* based on their morphological characteristics. The species identification based on their calmodulin sequences proved that 182 isolates belonged to *A. flavus*, 5 to *A. tamarii*, 1 to *A. pseudotamarii* species and 1 to *A. terreus*, which is not a member of section *Flavi*. It was the first occasion to detect *A. pseudotamarii* as causative agent of keratitis (Baranyi *et al.* 2013). *A. pseudotamarii* can only produce B-type aflatoxins similarly to *A. flavus*. In addition, we have identified one *A. minisclerotigenes* isolate from an infected coconut from South India. This species is able to produce both B- and G-type

aflatoxins. Moreover, we have identified two *A. parasiticus* isolates from indoor air from Croatia, one *A. nomius* isolate from a Hungarian cheese product and one *A. pseudonomius* isolate from maize seed from Serbia. To our knowledge, we are the first to have detected the Central European presence of the species able to produce G-type aflatoxins as well (Baranyi *et al.* 2015).

There are a lot of opportunistic human pathogenic species among the members of Aspergilli which could present very diverse antifungal susceptibility. We have tested an alternative method, E-test method instead of the conventional microdilution method. During the process, we have investigated the antifungal susceptibility of clinical strains, including 24 *A. flavus*, 4 *A. tamaraii* and 1 *A. pseudotamaraii*, all isolated from keratitis cases in India. The susceptibility of the isolates to echinocandins (*i.e.*, anidulafungin, micafungin and caspofungin), azoles (*i.e.*, itraconazole, voriconazole, posaconazole and fluconazole) and amphotericin B was investigated. The examined isolates were almost equally susceptible to echinocandins; nevertheless, microcolonies were observed in inhibition zones. In the case of amphotericin B, the *A. flavus* isolates were less susceptible in comparison with the *A. tamaraii* and *A. pseudotamaraii* isolates. Fluconazole was not able to inhibit Aspergilli, while the other triazols could efficiently block the growth of the *A. flavus*, *A. tamaraii*, and *A. pseudotamaraii* isolates. The most efficient ones were posaconazole and voriconazole. In accordance with earlier research in the subject, we have found that this method could be effective in choosing the appropriate clinical therapy for infections caused by *Aspergillus* species.

In addition their clinical importance some members of section *Flavi* are able to produce aflatoxins. According to the examinations of the isolates for their aflatoxin producing ability, we observed differences between the populations: 47% of the clinical isolates and 50% of the environmental isolates from South India were able to synthesize aflatoxins. However, only three (one clinical and two maize isolates from Hungary) of the *A. flavus* isolates derived from Central Europe (Serbia, Croatia, and Hungary) showed aflatoxin producing ability. The *A. nomius*, *A. pseudonomius* and *A. parasiticus* isolates were able to produce aflatoxins in different ratios and amounts depending on the applied media and incubation temperatures. In recent years, although aflatoxins have been observed in some grain and milk products in European countries, our results do not verify this phenomenon. Our hypothesis is that our isolates are the members of a non-aflatoxigenic *A. flavus* population. Further studies would be necessary to research the aflatoxin producing *A. flavus* strains both in Europe and in Hungary.

We have also examined the effects of media and temperatures on the aflatoxin production of three *A. flavus*, two *A. parasiticus*, one *A. nomius*, one *A. pseudonomius*, one *A. minisclerotigenes* and one *A. pseudotamarii* isolate. These strains were cultivated in yeast extract sucrose media on 25, 30 and 35 °C temperatures, and most of the strains preferred 30 °C for aflatoxin production, except for the two *A. parasiticus* isolates. After cultivation in brain heart infusion and RPMI media, the isolates could produce only low amount of aflatoxins in most cases, except for the *A. minisclerotigenes* and the *A. parasiticus* isolates.

Having investigated the genetic variability by microsatellite methodes, we could not observe the complete separation of the isolates from different habitats. However, some isolates deriving from maize and indoor air formed detached clades, and the mixed occurrence of the clinical and environmental isolates from India were noticed. In the case of UP-PCR, 8 primers were used altogether and a binomial matrix consisting of 74 sites were analyzed using neighbor joining analysis. On the phylogenetic tree, the four populations formed different clades according to their geographical origin.

Data from the partial calmodulin gene sequences and UP-PCR and microsatellite analyses were combined to create a phylogenetic tree. The four populations separated into well-defined clades. Phylogenetic analysis showed that the isolates deriving from indoor air and from maize formed a well-defined cluster with a high support value, while those originating from environmental and clinical samples from India segregated from the European isolates.

A. flavus is presumed strictly asexual; however, recently there have been a lot of evidence confirming the ability of sexual reproduction. *A. flavus* is a heterothallic fungus, and its strains typically contain one of the two mating-type genes: *MAT1-1* or *MAT1-2*. We amplified a 396 bp fragment of the *MAT1-1* gene and a 270 bp of the *MAT1-2* gene to identify the mating-type genes in the isolates. The dominant presence of the *MAT1-1* idiomorph was observed in the examined isolates, except for the clinical isolates deriving from Hungary, where the *MAT1-2* idiomorf dominated. Nine of the isolates carried both *MAT* alleles, which may prove the presence of heterocaryosis as suggested in former studies.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *J R Soc Interface* 2012, 9: 757-767.
- Abdel-Wahhab MA, Aly SE. Antioxidants and radical scavenging properties of vegetable extracts in rats fed aflatoxin contaminated diet. *J Agric Food Chem* 2003, 51: 2409-2414.
- Abdel-Wahhab MA, Said A, Huefner A. NMR and radical scavenging activities of Patuletin from *Urtica urens* against aflatoxin B₁. *Pharm Biol* 2005, 43: 515-525.
- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62: 35-54.
- Adrio JL, Demain AL. Fungal biotechnology. *Int Microbiol* 2003, 6: 191-199.
- Akiyama K, Takizawa H, Suzuki M, Miyachi S, Ichinohe M, Yanagihara Y. Allergic bronchopulmonary aspergillosis due to *Aspergillus oryzae*. *Chest* 1987, 91: 285-286.
- Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, D'Arco G, Passini C, Giraudi G. Occurrence of aflatoxin M₁ in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control* 2012, 25: 125-130.
- Araujo R, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Amorim A, Gusmao L. Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15: 260-266.
- Arikan S, Rex JH. Nystatin LF (Aronex/Abbott). *Curr Opin Investig Drugs* 2001, 2: 488-495.
- Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Gieseke K, Rogers HS, Kieszak S, Njapau H, Schleicher R, McCoy LF, Misore A, DeCock K, Rubin C, Slutsker L, Aflatoxin Investigative Group. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ Health Persp* 2005, 113: 1779-1783.
- Balajee SA, de Valk HA, Lasker BA, Meis JF, Klaassen CH. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol Methods* 2008, 73: 252-256.
- Baranyi N, Jakšić Despot D, Palágyi A, Kiss N, Kocsubé S, Szekeres A, Kecskeméti A, Bencsik O, Vágvolgyi C, Šegvić Klarić M, Varga J. Identification of *Aspergillus* species in Central Europe able to produce G-type aflatoxins. *Acta Biol Hung* 2015a, 66: 339-347.
- Baranyi N, Kocsubé S, Jakšić Despot D, Palágyi A, Šegvić Klarić M, Szekeres A, Bencsik O, Kecskeméti A, Manikandan P, Tóth B, György A, Kredics L, Chandrasekaran M,

- Vágvölgyi C, Varga J. Combined genetic and metabolic typing strategy reveals structural differences among *Aspergillus flavus* populations from different habitats. 2016 (szerkesztés alatt).
- Baranyi N, Kocsubé S, Szekeres A, Raghavan A, Narendran V, Vágvölgyi C, Panneer Selvam K, Babu Singh YR, Kredics L, Varga J, Manikandan P. Keratitis caused by *Aspergillus pseudotamarii*. *Med Mycol Case Rep* 2013a, 2: 91-94.
- Baranyi N, Kocsubé S, Tóth B, Palágyi A, Szekeres A, Pál R, Szarvas C, Győri T, Varga J, Vágvölgyi C. Identification of potential mycotoxin producing Aspergilli on agricultural products in Hungary. Power of microbes in industry and environment 2013, Primosten, Croatia. 2013b, 91. (absztrakt).
- Baranyi N, Kocsubé S, Vágvölgyi C, Varga J. Current trends in aflatoxin research. *Acta Biol Szeged* 2013c, 57: 95-107.
- Baranyi N, Kocsubé S, Varga J. Aflatoxins: Climate change and biodegradation. *Curr Op Food Sci* 2015b, 5: 60-66.
- Bartizal K, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM, Smith JG, Leighton CE, Bouffard A, Dropinski JF, Balkovec J. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41 (11): 2326-2332.
- Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailides TJ, Mahoney NE. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68: 2326-2329.
- Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Mittal S, Shivakumar C, Srinivasan M. Microbiological diagnosis of infective keratitis: comparative evaluation of direct microscopy and culture results. *Br J Ophthalmol* 2006, 90: 1271-1276.
- Bhatnagar D, Ehrlich KC, Cleveland TE. Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites. In: Bhatnagar D (ed). Handbook of applied mycology. Vol: V. Mycotoxins in ecological systems. New York, USA: Dekker, 1992: 255-285.
- Bhatnagar D, Ehrlich KC, Cleveland TE. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotech* 2003, 61: 83-93.
- Bilandzić N, Varenina I, Solomun B. Aflatoxin M₁ in raw milk in Croatia. *Food Control* 2010, 21: 1279-1281.
- Blout WP. Turkey "X" disease. *Turkeys* 1961, 9: 52-77.
- Borbély M, Sipos P, Pelles F, Győri Z. Mycotoxin contamination in cereals. *J Agroalim Proc Techn* 2010, 16: 96-98.

- Borelli D, Bran JL, Fuentes J, Legendre R, Leiderman E, Levine HB, Restrepo A, Stevens DA. Ketoconazole, an oral antifungal: laboratory and clinical assessment of imidazole drugs. *Postgrad Med J* 1979, 55: 657-661.
- Brakhage AA. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* 2013, 11: 21-32.
- Bulat SA, Lübeck M, Mironenko N, Jensen DF, Lübeck PS. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Mycol Res* 1998, 102: 933-943.
- Bulat SA, Mironenko NV, Lapteva MN, Strelchenko PP. Polymerase chain reaction with universal primers (UP-PCR) and its application to plant genome analysis. In: Adams RP, Miller JS, Goldenberg EM, Adams JE (eds). Conservation of plant genes II, vol. 8. Utilization of ancient and modern DNA. St. Louis, USA: Missouri Botanical Garden, 1994: 113-129.
- Calderari TO, Iamanaka BT, Frisvad JC, Pitt JI, Sartori D, Pereira JL, Fungaro MH, Taniwaki MH. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. *Int J Food Microbiol* 2013, 160 (3): 267-272.
- Campbell CK. Forms of aspergillosis. In: Powell KA, Renwick A, Peberdy JF (eds). The Genus *Aspergillus*. New York, USA: Plenum, 1994: 313-320.
- Cano-Sancho G, Perelló G, Nadal M, Domingo JL. Comparison of the nutritional composition and the concentrations of various contaminants in branded and private label yogurts. *J Food Compost Anal* 2015, 42: 71-77.
- Cary JW, Linz JE, Bhatnagar D. Aflatoxins: biological significance and regulation of biosynthesis. In: Cary JW (ed). Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Lancaster, UK: Technomic, 2000: 317-361.
- Casseltan L, Zolan M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* 2002, 3: 683-697.
- Chakrabarti A, Gupta V, Biswas G, Kumar B, Sakhuja VK. Primary cutaneous aspergillosis: our experience in 10 years. *J Infect* 1998, 37: 24-27.
- Chakrabarti A, Sethi S, Raman DS, Behera D. Eight-year study of allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Indian teaching hospital. *Mycoses* 2002, 45: 295-299.
- Chao TC, Maxwell SM, Wong SY. An outbreak of aflatoxicosis and boric acid poisoning in Malaysia: a clinicopathological study. *J Path* 1991, 164: 225-233.
- Chiller T, Farrokhshad K, Brummer E, Stevens DA. Influence of human sera on the in vitro activity of the echinocandin caspofungin (MK-0991) against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44 (12): 3302-3305.

- Chowdhary A, Singh K. Spectrum of fungal keratitis in North India. *Cornea* 2005, 24: 8-15.
- Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol* 1994, 60: 847-852.
- Clinical Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. M38-A. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute, 2002.
- Cohen J, Denning DW, Viviani MA. Epidemiology of invasive aspergillosis in European cancer centres. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993, 12: 392-393.
- Cole RJ, Schweikert MA. Handbook of secondary fungal metabolites. Vol. 1. San Diego, USA: Academic Press, 2003.
- Cotty PJ. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 1994, 84: 1270-1277.
- Cotty PJ. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycol Res* 1997, 101: 698-704.
- Cotty PJ, Jaime-Garcia R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol* 2007, 119: 109-115.
- Cotty PJ, Mellon JE. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Res* 2006, 22: 110-117.
- Coulter JBS, Sulima GI, Lamplugh SM, Mukhtar BI, Hendrickse RG. Aflatoxins in liver biopsies from Sudanese children. *Am J Trop Med Hyg* 1986, 35: 360-365.
- Curtui V, Usleber E, Dietrich R, Lepschy J, Märtlbauer E. A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia* 1998, 143: 97-103.
- Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis* 2000, 31 (6): 1524-1528.
- Davis N, Diener U, Eldridge D. Production of aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl Microbiol* 1966, 14 (3): 378-380.
- De Beule K, Van Gestel J. Pharmacology of itraconazole. *Drugs* 2001, 61 (Suppl 1): 27-37.
- de Pauw BE. New antifungal agents and preparations. *Int J Antimicrob Agents* 2000, 16 (2): 147-150.

- de Valk HA, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: strengths, pitfalls and solutions. *J Microbiol Methods* 2007, 69: 268-272.
- Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: Borkovich KA, Ebbole DJ (eds). Cellular and molecular biology of filamentous fungi. Washington, USA: ASM Press, 2010: 501-535.
- Debuchy R, Turgeon B. Mating-type structure, evolution, and function in Euascomycetes. In: Kues U, Fischer R (eds). The Mycota, growth, differentiation, and sexuality, vol. 1. Berlin, Germany: Springer, 2006: 293-323.
- Degola F, Berni E, Dall'Asta C, Spotti E, Marchelli R, Ferrero I, Restivo FM. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* 2007, 103: 409-417.
- Dehghan P, Bui T, Campbell LT, Lai YW, Tran-Dinh N, Zaini F, Carter DA. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of clinical isolates of *Aspergillus flavus* from Iran reveals the first cases of *Aspergillus minisclerotigenes* associated with human infection. *BMC Infect Dis* 2014, 14: 358.
- Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998, 26 (4): 781-805.
- Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis* 2003, 37: S265-S280.
- Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000, 30 (4): 653-657.
- Dobolyi C, Sebők F, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Baranyi N, Szécsi Á, Tóth B, Varga M, Kriszt B, Szoboszlai S, Krifaton C, Kukolya J. Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Aliment Hung* 2013, 42: 451-459.
- Dorner JW, Cole RJ, Wicklow DT. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. *J Food Prot* 1999, 62: 650-656.
- Doster MA, Cotty PJ, Michailides TJ. Description of a distinctive aflatoxin-producing strain of *Aspergillus nomius* that produces submerged sclerotia. *Mycopathologia* 2009, 168: 193-201.
- Dyer PS, O'Gorman CM. A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr Opin Microbiol* 2011, 14: 649-654.
- Dyer PS, O'Gorman CM. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Rev* 2012, 36: 165-192.

- Dyer PS, Paoletti M. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med Mycol* 2005, 43 (Suppl 1): 7-14.
- Eaton DL, Groopman JD. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. San Diego, USA: Academic Press, 1994.
- Ehrlich KC, Cotty PJ. An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 65: 473-478.
- Ehrlich KC, Kobbeman K, Montalbano BG, Cotty PJ. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *Int J Food Microbiol* 2007, 114: 153-159.
- Ehrlich KC, Li P, Scharfenstein L, Chang PK. HypC, the anthrone oxidase involved in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76 (10): 3374-3377.
- Ehrlich KC, Mack BM, Wei Q, Li P, Roze LV, Dazzo F, Cary JW, Bhatnagar D, Linz JE. Association with *aflR* in endosomes reveals new functions for *aflJ* in aflatoxin biosynthesis. *Toxins* 2012, 4: 1582-1600.
- Ehrlich KC, Montalbano BG, Bhatnagar D, Cleveland TE. Alteration of different domains in *AflR* affects aflatoxin pathway metabolism in *Aspergillus parasiticus* transformants. *Fungal Genet Biol* 1998, 23: 279-287.
- Ehrlich KC, Yu J, Cotty PJ. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *J Appl Microbiol* 2005, 99: 518-527.
- Ernst EJ. Investigational antifungal agents. *Pharmacotherapy* 2001, 21 (8 Pt 2): 165S-174S.
- Espinel-Ingroff A. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001, 39 (3): 954-958.
- Espinel-Ingroff A. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). *J Clin Microbiol* 2003, 41: 403-409.
- Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Jr C, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. A multicenter evaluation of the standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 139-143.
- Espinel-Ingroff A, Rezusta A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents:

- comparison with NCCLS broth microdilution method. *J Clin Microbiol* 2002, 40 (6): 2101-2017.
- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.67 Distributed by the author. Department of Genome Sciences and Department of Biology University of Washington, Seattle, 2007.
- Ferreira G, Boer CG, Peralta RM. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaraii* in solid state fermentation. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 173: 335-339.
- Ferreiro JA, Carlson BA, Cody DT. 3rd. Paranasal sinus fungus balls. *Head Neck* 1997, 19: 481-486.
- Frisvad JC, Frank JM, Houbrakren JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol* 2004a, 50: 23-43.
- Frisvad JC, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus* species and aflatoxin production: a reappraisal. In: Tuijtelaars ACJ (ed). Food microbiology and food safety into the next millennium. Zeist, the Netherlands: Foundation Food Micro '99, 1999: 125-126.
- Frisvad JC, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol* 2004b, 49: 201-242.
- Frisvad JC, Samson RA. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B₁. *System Appl Microbiol* 2004, 27: 672-680.
- Frisvad JC, Samson RA, Smedsgaard J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B₁, B₂ and sterigmatocystin. *Lett Appl Microbiol* 2004c, 38: 440-445.
- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2005, 28: 442-453.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem* 2007, 55: 9727-9732.
- Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990, 12 (2): 308-329.
- Geiser DM. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med Mycol* 2009, 47 (Suppl 1): 21-26.
- Geiser DM, Dorner JW, Horn BW, Taylor JW. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 2000, 31: 169-179.

- Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 388-393.
- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak MJ, Vlegaar R, Kriek NPJ. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 1988, 54: 1806-1811.
- Georgianna DR, Payne GA. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genet Biol* 2009, 46: 113-125.
- Goto T, Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT. Mycotoxin producing ability of *Aspergillus tamarii*. *Mycotoxins* 1997, 44: 17-20.
- Goto T, Wicklow DT, Ito Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. *Appl Env Microbiol* 1996, 62: 4036-4038.
- Graybill JR. The echinocandins, first novel class of antifungals in two decades: will they live up to their promise? *Int J Clin Pract* 2001, 55 (9): 633-638.
- Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996, 33 (1): 23-32.
- Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Canad J Physio Pharmacol* 1996, 74: 203-209.
- Grubisha LC, Cotty PJ. Genetic isolation among sympatric vegetative compatibility groups of the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Mol Ecol* 2010, 19: 269-280.
- Haberle V. Aflatoxin M₁ determination in samples of market milk produced in Croatia. *Hrana I Ishrana*. 1988, 29: 195-196 (in Croatian).
- Hadrich I, Drira I, Neji S, Mahfoud N, Ranque S, Makni F, Ayadi A. Microsatellite typing of *Aspergillus flavus* from clinical and environmental avian isolates. *J Med Microbiol* 2013, 62: 121-125.
- Hajdu R, Thompson R, Sundelof JG, Pelak BA, Bouffard FA, Dropinski JF, Kropp H. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41 (11): 2339-2344.
- Hawksworth DL. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2011a, 2: 155-162.
- Hawksworth DL. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Med Mycol* 2011b, 49: 70-76.

- Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA, Reynolds DR, Samson RA, Seifert KA, Taylor JW, Wingfield MJ, Abaci O, Aime C, Asan A, Bai FY, de Beer ZW, Begerow D, Berikten D, Boekhout T, Buchanan PK, Burgess T, Buzina W, Cai L, Cannon PF, Crane JL, Damm U, Daniel HM, van Diepeningen AD, Druzhinina I, Dyer PS, Eberhardt U, Fell JW, Frisvad JC, Geiser DM, Geml J, Glienke C, Gräfenhan T, Groenewald JZ, Groenewald M, de Gruyter J, Guého-Kellermann E, Guo LD, Hibbett DS, Hong SB, de Hoog GS, Houbraken J, Huhndorf SM, Hyde KD, Ismail A, Johnston PR, Kadaifciler DG, Kirk PM, Kõljalg U, Kurtzman CP, Lagneau PE, Lévesque CA, Liu X, Lombard L, Meyer W, Miller A, Minter DW, Najafzadeh MJ, Norvell L, Ozerskaya SM, Oziç R, Pennycook SR, Peterson SW, Pettersson OV, Quaedvlieg W, Robert VA, Ruibal C, Schnürer J, Schroers HJ, Shivas R, Slippers B, Spierenburg H, Takashima M, Taşkın E, Thines M, Thrane U, Uztan AH, van Raak M, Varga J, Vasco A, Verkley G, Videira SI, de Vries RP, Weir BS, Yilmaz N, Yurkov A, Zhang N. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2011, 2: 105-112.
- Hazen EL, Brown R. Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science* 1950, 112 (2911): 423.
- Hedayati MT, Mayahi S, Movahedi M, Shokohi T. Study on fungal flora of tap water as a potential reservoir of fungi in hospitals in Sari city, Iran. *J Mycol Med* 2011, 21: 10-14.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 2007, 153: 1677-1692.
- Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 2005, 97 (6): 1316-1329.
- Hong SB, Lee M, Kim DA, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One* 2013, 8 (5): e63769.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol* 2005, 43 (Suppl 1): S207-S238.
- Horn BW, Dorner JW. Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia* 1998, 90: 767-776.
- Huang A, Edwards F, Bernard EM, Armstrong D, Schmitt HJ. *In vitro* activity of the new semi-synthetic polypeptide cilofungin (LY121019) against *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990, 9 (9): 697-699.

- Hussain S, Salahuddin N, Ahmad I, Salahuddin I, Jooma R. Rhinocerebral invasive mycosis: occurrence in immunocompetent individuals. *Eur J Radiol* 1995, 20: 151-155.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) A review of human carcinogens. Vol. 100F: Chemical agents and related occupations. Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012.
- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, Goto T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycol Res* 2001, 105: 233-239.
- Iwen PC, Rupp ME, Hinrichs SH. Invasive mold sinusitis: 17 cases in immunocompromised patients and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1997, 24: 1178-1184.
- Jakić-Dimić D, Nesić K, Petrović M. Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*. *Biotechnol Anim Husband* 2009, 25: 1203-1208.
- Jaksić SM, Prunić Z, Milanov DS, Jajić M, Abramović F. Fumonisin and co-occurring mycotoxins in North Serbian corn. *Proc Nat Sci Matica Srpska Novi Sad* 2011, 120: 49-59.
- Jong SC, Birmingham JM. Current status of fungal culture collections and their role in biotechnology. In: Arora DK, Elander RP, Murekji KG (eds). Handbook of applied mycology, vol. 4: Fungal biotechnology. New York, USA: Marcel Dekker, 1992: 993-1024.
- Kameswaran M, Al-Wadei A, Khurana P, Okafor BC. Rhinocerebral aspergillosis. *J Laryngol Otol* 1992, 106: 981-985.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 2013, 30: 772-780.
- Kennedy CA, Adams GL, Neglia JP, Giebink GS. Impact of surgical treatment on paranasal fungal infections in bone marrow transplant patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997, 116: 610-616.
- Khairallah SH, Byrne KA, Tabbara KF. Fungal keratitis in Saudi Arabia. *Doc Ophthalmol* 1992, 79: 269-276.
- Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.
- Klich MA. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol Plant Pathol* 2007a, 8: 713-722.
- Klich MA. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 2007b, 48: 71-80.

- Klich M, Mullaney EJ, Daly CB, Cary JW. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl. Microbiol Biotechnol* 2000, 53: 605-609.
- Klich MA, Tang S, Denning DW. Aflatoxin and ochratoxin production by *Aspergillus* species under *ex vivo* conditions. *Mycopathologia* 2009, 168 (4): 185-191.
- Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi PR, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, Machida M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, 71: 646-670.
- Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002, 359: 1135-1144.
- Kornsakulkarn J, Saepua S, Laksanacharoen P, Rachtawee P, Thongpanchang C. Xanthone and anthraquinone-type mycotoxins from the scale insect fungus *Aschersonia marginata* BCC 28721. *Tetrahedron Lett* 2013, 54: 3813-3815.
- Kornsakulkarn J, Saepua S, Srichomthong K, Supothina S, Thongpanchang C. New mycotoxins from the scale insect fungus *Aschersonia coffeae* Henn. BCC 28712. *Tetrahedron* 2012, 68: 8480-8486.
- Kos J, Levi J, Duragi O, Koki B, Miladinovi I. Occurrence and estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk in Serbia. *Food Control* 2014, 38: 41-46.
- Kredics L, Varga J, Kocsubé S, Dóczy I, Samson RA, Rajaraman R, Narendran V, Bhaskar M, Vágvölgyi C, Manikandan P. Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii*. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 3464-3467.
- Krishnamachari KA, Nagaarajan V, Bhat RV, Tilak TB. Hepatitis due to aflatoxicosis - an outbreak in Western India. *The Lancet* 1975, 305: 1061-1063.
- Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009, 52: 206-222.
- Kronstad JW. Self-fertility: the genetics of sex in lonely fungi. *Curr Biol* 2007, 17: R843-R845.
- Kumeda Y, Asao T, Takahashi H, Ichinoe M. High prevalence of B and G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field soil in Japan: Heteroduplex panel analysis identifies a new genotype within *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. *FEMS Microbiol Ecol* 2003, 45: 229-238.
- Kurosawa M, Kobayashi S, Yanagihara Y, Shida T. A case of occupational allergic bronchopulmonary aspergillosis unique to Japan. *Br J Clin Pract* 1990, 44: 482-489.
- Kurtz MB, Heath IB, Marrinan J, Dreikorn S, Onishi J, Douglas C. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 1994, 38 (7): 1480-1489.

- Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1987, 53: 147-158.
- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12 (2): 310-350.
- Lee SC, Ni M, Li W, Shertz C, Heitman J. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010, 74 (2): 298-340.
- Levin RE. PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *Int J Food Microbiol* 2012, 156: 1-6.
- Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, Nyamongo J, Backer L, Dahiye AM, Misore A, DeCock K, Rubin C, Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ Health Perspect* 2005, 113: 1763-1767.
- Link HF. Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertatio prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin. *Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde* 1809, 3: 1-42.
- Liu BH, Chu FS. Regulation of *aflR* and its product, AflR, associated with aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64: 3718-3723.
- Loeffler J, Stevens DA. Antifungal Drug Resistance. *Clin Infect Dis* 2003, 36 (Suppl 1): S31-S41.
- Lübeck PS, Alekhina IA, Lübeck M, Bulat SA. UP-PCR genotyping and rDNA analysis of *Ascochyta pisi* Lib. *J Phytopathol* 1998, 146: 51-55.
- Lye MS, Ghazali AA, Mohan J, Alwin N, Nair RC. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 1995, 53: 68-72.
- Manikandan P, Dóczy I, Kocsubé S, Varga J, Németh TM, Antal Z, Vágvölgyi C, Bhaskar M, Kredics L. *Aspergillus* species in human keratomycosis. In: Varga J, Samson RA (eds). *Aspergillus in the Genomic Era*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2008: 293-328.
- Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Anita R, Revathi R, Németh TM, Narendran V, Vágvölgyi C, Panneer Selvam K, Shobana CS, Babu Singh YR, Kredics L. Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South-India and antifungal susceptibilities of the causative agents. *Mycoses* 2013, 56: 26-33.

- Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Samson RA, Anita R, Revathi R, Dóczy I, Németh TM, Narendran V, Vágvolgyi C, Manoharan C, Kredics L. Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius*. *J Clin Microbiol* 2009, 47: 3382-3385.
- Martos AI, Romero A, González MT, González A, Serrano C, Castro C, Pemán J, Cantón E, Martín-Mazuelos E. Evaluation of the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. *Med Mycol* 2010, 48 (6): 858-861.
- Massi FP, Vieira ML, Sartori D, Penha RE, de Freitas Munhoz C, Ferreira JM, Iamanaka BT, Taniwaki MH, Frisvad JC, Fungaro MH. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. *Int J Food Microbiol* 2014, 186: 14-21.
- Mauro A, Battilani P, Callicott KA, Giorni P, Pietri A, Cotty PJ. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *Int J Food Microbiol* 2013, 162: 1-7.
- Mayura K, Abdel-Wahhab MA, McKenzie KS, Sarr AB, Edwards JF, Naguib K, Phillips TD. Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: Potential for Hidden Risks. *Toxicol Sci* 1998, 41: 175-182.
- McGuire SM, Silva JC, Casillas EG, Townsend CA. Purification and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. Catalysis of the stereodifferentiating cyclization in aflatoxin biosynthesis essential to DNA interaction. *Biochemistry* 1996, 35: 11470-11486.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland N (eds. & comps.) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code), adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Königstein, Germany: Koeltz Scientific Books, 2012.
- Meis JF, Verweij PE. Current management of fungal infections. *Drugs* 2001, 61 (Suppl 1): 13-25.
- Micheli PA. Iuxta Tournefortii methodum disposita. *Nova Plantarum Genera* 1729, 212. (Reprint: Richmond Publishing Company 1976.)
- Minto RE, Townsend CA. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chem Rev* 1997, 97: 2537-2555.
- Miraglia M, Marvin HJ, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, Cubadda F, Croci L, De Santis B, Dekkers S, Filippi L, Hutjes RW, Noordam MY, Pisante M, Piva G, Prandini A, Toti L,

- van den Born GJ, Vespermann A. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food Chem Toxicol* 2009, 47: 1009-1021.
- Moore BC, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning DW. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect* 2000, 41: 203-220.
- Moore GG, Elliott JL, Singh R, Horn BW, Dorner JW, Stone EA, Chulze SN, Barros GG, Naik MK, Wright GC, Hell K, Carbone I. Sexuality generates diversity in the aflatoxin gene cluster: evidence on a global scale. *PLoS Pathog* 2013, 9 (8): e1003574.
- Moore GG, Singh R, Horn BW, Carbone I. Recombination and lineage-specific gene loss in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus flavus*. *Mol Ecol* 2009, 18: 4870-4887.
- Moreira FG, Lenartovicz V, Peralta RM. A thermostable maltose-tolerant alpha-amylase from *Aspergillus tamarii*. *J Basic Microbiol* 2004, 44: 29-35.
- Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, Fridkin SK, Pappas PG, Warnock DW. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 2005, 43 (Suppl 1): S49-S58.
- Morrow PE. Physics of airborne particles and their deposition in the lung. *Ann N Y Acad Sci* 1980, 353: 71-80.
- Naumov GI, Naumova ES, Kondratieva VI, Bulat SA, Mironenko NV, Mendonça-Hagler LC, Hagler AN. Genetic and molecular delineation of three sibling species in the *Hansenula polymorpha* complex. *Syst Appl Microbiol* 1997, 20: 50-56.
- Ngindu A, Johnson BK, Kenya PR, Ngira JA, Ocheng DM, Nandwa H, Omondi TN, Jansen AJ, Ngare W, Kaviti JN, Gatei D, Siongok TA. Outbreak of acute hepatitis by aflatoxin poisoning in Kenya. *The Lancet* 1982, 319: 1346-1348.
- Ni M, Yu JH. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2007, 2: e970.
- Nielsen O, Lübeck PS. Characterisation of symbionts of entomopathogenic nematodes by universally primed-PCR (UP-PCR) and UP-PCR product cross-hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* 2002, 215 (1): 63-68.
- Olarte RA, Horn BW, Dorner JW, Monacell JT, Singh R, Stone EA, Carbone I. Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Mol Ecol* 2012, 21 (6): 1453-1476.
- Olsen M, Johnsson P, Möller T, Paladino R, Lindblad M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin J* 2008, 1: 123-126.

- Orum TV, Bigelow DM, Nelson MR, Howell DR, Cotty PJ. Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma Country, Arizona, soils. *Plant Dis* 1997, 81: 911-916.
- Panda NK, Sharma SC, Chakrabarti A, Mann SB. Paranasal sinus mycoses in north India. *Mycoses* 1998, 41: 281-286.
- Paoletti M, Rydholm C, Schwieger EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, Debeaupuis JP, Latgé JP, Denning DW, Dyer PS. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* 2005, 15: 1242-1248.
- Paoletti M, Seymour FA, Alcocer MJC, Kaur N, Calvo AM, Archer DB, Dyer PS. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 2007, 17: 1384-1389.
- Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001, 33 (2): 173-186.
- Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12 (11): 1060-1076.
- Paterson RRM, Kelley J, Gallagher M. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. *Lett Appl Microbiol* 1997, 25: 435-436.
- Paterson RRM, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res Int* 2010, 43: 1902-1914.
- Patten RC. Aflatoxins and disease. *Am J Trop Med Hyg* 1981, 30: 422-425.
- Perrone G, Haidukowski M, Stea G, Epifani F, Bandyopadhyay R, Leslie JF, Logrieco A. Population structure and aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiol* 2014, 41: 52-59.
- Pildain MB, Frisvad JC, Vaamonde G, Cabral D, Varga J, Samson RA. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, 58: 725-735.
- Pleadin J, Vulić A, N Perši N, Škrivanko M, Capek B, Cvetni Z. Aflatoxin B₁ occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* 2014, 40: 286-291.
- Polovinski-Horvatović M, Juric V, Glamocic D. Two year study of incidence of aflatoxin M₁ in milk in the region of Serbia. *Biotechnol Anim Husband* 2009, 25: 713-718.
- Pontecorvo G. The parasexual cycle in fungi. *Annu Rev Microbiol* 1956, 10: 393-400.

- Price MS, Yu J, Nierman WC, Kim HS, Pritchard B, Jacobus CA, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA. The aflatoxin pathway regulator *AflR* induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol Lett* 2006, 255: 275-279.
- Proffitt RT, Satorius A, Chiang SM, Sullivan L, Adler-Moore JP. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. *J Antimicrob Chemother* 1991, 28 (Suppl B): 49-61.
- Puel O, Galtier P, Oswald IP. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2010, 2: 613-631.
- Ramírez-Camejo LA, Zuluaga-Montero A, Lázaro-Escudero M, Hernández-Kendall V, Bayman P. Phylogeography of the cosmopolitan fungus *Aspergillus flavus*: is everything everywhere? *Fungal Biol* 2012, 116: 452-463.
- Ramírez-Prado JH, Moore GG, Horn BW, Carbone I. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet Biol* 2008, 45 (9): 1292-1299.
- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol* 2011, 115: 406-420.
- Richard JL, Bhatnagar D, Peterson S, Sandor G. Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia* 1992, 120: 183-188.
- Rodriguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Dennind DW, Cuenza-Estrella M. Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 5236-5237.
- Rokas A, Payne G, Fedorova ND, Baker SE, Machida M, Yu J, Georgianna DR, Dean RA, Bhatnagar D, Cleveland TE, Wortman JR, Maiti R, Joardar V, Amedeo P, Denning DW, Nierman WC. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Stud Mycol* 2007, 59: 11-17.
- Robens J, Cardwell KF. The Costs of Mycotoxin Management to the USA: Management of Aflatoxins in the United States. *Toxin Rev* 2003, 22 (2-3): 139-152.
- Rudwan MA, Sheikh HA. Aspergilloma of paranasal sinuses - a common cause of unilateral proptosis in Sudan. *Clin Radiol* 1976, 27: 497-502.
- Sabo JA, Abdel-Rahman SM. Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann Pharmacother* 2000, 34 (9): 1032-1043.

- Saha R, Das S. Mycological profile of infectious Keratitis from Delhi. *Indian J Med Res* 2006, 123: 159-164.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 2010. (CBS Laboratory Manual Series; No. 2).
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Stud Mycol* 2007, 59: 129-145.
- Saravanan K, Panda NK, Chakrabarti A, Das A, Bapuraj RJ. Allergic fungal rhinosinusitis: an attempt to resolve the diagnostic dilemma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006, 132: 173-178.
- Sargeant K, Sheridan A, O'Kelley J, Carnaghan RBA. Toxicity associated with certain samples of groundnut. *Nature* 1961, 192: 1096-1097.
- Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, Geisen R. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *Int J Food Microbiol* 2009, 135: 231-237.
- Shapira R, Paster N, Eyal O, Menasherov M, Mett A, Salomon R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62: 3270-3273.
- Shweta S, Kannan K, Madhavan S, Adhithya R, Paranidharan V, Velazhahan R. RAPD analysis of genetic diversity among the isolates of *Aspergillus flavus* from different hosts and locations. *Arch Phytopathology Plant Prot* 2013; 46 (18): 2174-2181.
- Shi JY, Xu YC, Shi Y, Lü HX, Liu Y, Zhao WS, Chen DM, Xi LY, Zhou X, Wang H, Guo LN. *In vitro* susceptibility testing of *Aspergillus* spp. against voriconazole, itraconazole, posaconazole, amphotericin B and caspofungin. *Chin Med J (Engl)* 2010, 123 (19): 2706-2709.
- Shivaprakash MR, Geertsens E, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. *In vitro* susceptibility of 188 clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus* for the new triazole isavuconazole and seven other antifungal drugs. *Mycoses* 2011, 54 (5): 583-589.
- Silva JC, Minto RE, Barry CE III, Hollandand KA, Townsend CA. Isolation and characterization of the versicolorin B synthase gene from *Aspergillus parasiticus*: expansion of the aflatoxin B₁ biosynthetic cluster. *J Biol Chem* 1996, 271: 13600-13608.
- Silva JC, Townsend CA: Heterologous expression, isolation, and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. *J Biol Chem* 1996, 272: 804-813.
- Sohn KT, Yoon KS. Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 2002, 30: 117-127.

- Somma S, Perrone G, Logrieco AF. Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathol Mediterr* 2012, 51 (1): 131-147.
- Speare AT. Fungi parasitic upon insects injurious to sugar cane. Pathology and Physiological Series, Bulletin No. 12. Honolulu: Hawaiian Sugar Planters' Association Experiment Station, 1912: 62.
- Squire RA. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 1981, 214: 877-880.
- Srinivasan M, Gonzales CA, George C, Cevallos V, Mascarenhas JM, Asokan B, Wilkins J, Smolin G, Whitcher JP. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. *Br J Ophthalmol* 1997, 81: 965-971.
- Staib F, Rajendran C, Mishra SK, Voigt R, Lindlar F, Hartmann C, Weber R, Nowotny P. An atypical *Aspergillus flavus* from a case of bronchopulmonary aspergilloma. A contribution to the cultural and serological diagnosis of *A. flavus* infections. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1983, 255: 361-367.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014, 30 (9): 1312-1313.
- Steinbach WJ, Stevens DA. Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2003, 37 (Suppl 3): S157-S187.
- Stevens DA. The role of miconazole in systemic fungal infections. *Am Rev Respir Dis* 1977, 116: 801-806.
- Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, Bennett JE, Walsh TJ, Patterson TF, Pankey GA. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000, 30 (4): 696-709.
- Stockmann-Juvala H, Savolainen K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. *Hum Exp Toxicol* 2008, 27: 799-809.
- Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DI, Rinaldi MG, Graybill JR. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46 (5): 1581-1582.
- Susca A, Proctor RH, Butchko RAE, Haidukowski M, Stea G, Logrieco A, Moretti A. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin- producing and non producing black aspergilli. *Fungal Genet Biol* 2014, 73: 39-52.
- Tabuc C, Marin D, Guerre P, Sesan T, Bailly JD. Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *J Food Prot* 2009, 72: 662-665.

- Taj-Aldeen SJ, Hilal AA, Chong-Lopez A. Allergic *Aspergillus flavus* rhinosinusitis: a case report from Qatar. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003, 260: 331-335.
- Taj-Aldeen SJ, Hilal AA, Schell WA. Allergic fungal rhinosinusitis: a report of 8 cases. *Am J Otolaryngol* 2004, 25: 213-218.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013, 30 (12): 2725-2729.
- Taniwaki MH, Pitt JI, Imanaka BT, Sartori D, Copetti MV, Balajee A, Fungaro MH, Frisvad JC. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLoS One* 2012, 7: e42480.
- Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F, Kuwahara S. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44 (1): 57-62.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annu Rev Phytopathol* 1999, 37: 197-246.
- Thakar A, Sarkar C, Dhiwakar M, Bahadur S, Dahiya S. Allergic fungal sinusitis: expanding the clinicopathologic spectrum. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004, 130: 209-216.
- Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16: 730-797.
- Tirado MC, Clarke R, Jaykus LA, McQuatters-Gollop A, Frank JM. Climate change and food safety: A review. *Food Res Int* 2010, 43: 1745-1765.
- Torkar KG, Vengust A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M₁ in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 2007, 19: 570-577.
- Tóth B, Kótai É, Varga M, Pálfi X, Baranyi N, Szigeti G, Kocsibé S, Varga J. Climate change and mycotoxin contamination in Central Europe: an overview of recent findings. *Rev Agricult Rural Devel* 2013, 2: 461-466.
- Turgeon BG, Yoder OC. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* 2000, 31 (1): 1-5.
- van Belkum A. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr Opin Microbiol* 1999, 2: 306-311.
- van Burik JA, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 3115-3121.
- van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965, 205: 1112-1113.

- van der Zijden ASM, Blanche Koelensmid WAA, Boldingh J, Barrett CB, Ord WO, Philip J. *Aspergillus flavus* and Turkey X disease: isolation in crystalline form of a toxin responsible for Turkey X disease. *Nature* 1962, 195: 1060-1062.
- van Etten EWM, Stearne-Cullen LET, Ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IAJM. Efficacy of Liposomal Amphotericin B with Prolonged Circulation in Blood in Treatment of Severe Pulmonary Aspergillosis in Leukopenic Rats. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44 (3): 540-545.
- Varga J. Molecular typing of Aspergilli: recent developments and outcomes. *Med Mycol* 2006, 44: 149-161.
- Varga J, Baranyi N, Chandrasekaran M, Vágvölgyi C, Kocsubé S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biol Szeged* 2015a, 59 (2): 151-167.
- Varga J, Baranyi N, Szekeres A, Szigeti G, Nagy L, Kocsubé S. Mikotoxinok, mikotoxinogén gombák, micetizmusok. Szeged, Magyarország: SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék, Egyetemi jegyzet, 2015b. *TÁMOP-4.1.1.C- 12/1/KONV-2012-0014*.
- Varga J, Due M, Frisvad JC, Samson RA. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol* 2007, 59: 89-106.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin J* 2009, 2 (3): 263-277.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud Mycol* 2011, 69 (1): 57-80.
- Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Baranyi N, Tóth B. *Aspergillus* mycotoxins. In: Paterson RRM and Lima N (eds). *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. Boca Raton: CRC Press, 2012: 165-187.
- Varga J, Rigó K, Téren J, Mesterházy Á. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal Res Commun* 2001, 29: 85-92.
- Varga J, Szigeti G, Baranyi N, Kocsubé S, O'Gorman CM, Dyer PS. *Aspergillus*: sex and recombination. *Mycopathologia* 2014, 178 (5-6): 349-362.
- Varga J, Tóth B. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Genet Evol* 2003, 3: 3-17.
- Vermani M, Vijayan VK, Menon B, Kausar MA, Agarwal MK. Physico-chemical and clinico-immunologic studies on the allergenic significance of *Aspergillus tamarii*, a common airborne fungus. *Immunobiology* 2011, 216 (3): 393-401.

- Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud Mycol* 2014, 78: 1-61.
- Vojvodic S, Jensen AB, James RR, Boomsma JJ, Ellenberg J. Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Vet Microbiol* 2011, 149: 200-205.
- Walsh TJ, Viviani MA, Arathoon E, Chiou C, Ghannoum M, Groll AH, Odds FC. New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Med Mycol* 2000, 38 (Suppl 1): 335-347.
- Wicklow DT, Vesonder RF, Mcalpin CE, Cole RJ, Roquebert MF. Examination of *Stilbothamnium togoense* for *Aspergillus flavus* group mycotoxins. *Mycotaxon* 1989, 34: 249-252.
- Woloshuk CP, Foutz KR, Brewer JF, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA. Molecular characterization of *aflR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 1994, 60: 2408-2414.
- Yabe K, Hamasaki T. Stereochemistry during aflatoxin biosynthesis: cyclase reaction in the conversion of versiconal to versicolorin B and racemization of versiconal hemiacetal acetate. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59: 2493-2500.
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70: 1253-1262.
- Yu JH, Butchko RAE, Fernandes M, Keller NP, Leonard TJ, Adams TH. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Genet* 1996, 29: 549-555.
- Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GA, Balko TV, Zelenitsky SA, Friesen M, Kabani A, Turik M, Hoban DJ. *In vitro* activity of a new semisynthetic echinocandin, LY-303366, against systemic isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41 (4): 863-865.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy PhD munkámat a tanszéken végezzem.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Varga Jánosnak, amiért az elmúlt hat évben irányította és támogatta munkámat. Köszönöm belém fektetett bizalmát, és hogy minden segítséget megadott munkám sikeres elvégzéséhez és szakmai fejlődésemhez.

Köszönet illeti Dr. Kocsubé Sándort, aki a kezdetektől segítette munkámat, megosztotta velem elméleti és gyakorlati szaktudását. Köszönöm az évek során kapott rengeteg támogatást, tanácsot és biztatást, valamint a filogenetikai analízisben és az ábrák szerkesztésében nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom a témavezetőm által irányított kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának, valamint a 312. labor minden dolgozójának: Szigeti Gyöngyinek és Kiss Noéminek, továbbá Dr. Takó Miklósnak, Dr. Galgóczy Lászlónak, Dr. Virágh Máténak, Tóth Liliánának, Vidács Anitának, Kerekes Erikának, Kotogán Alexandrának, Nacsá-Farkas Elvirának és Szarkándi János Gergőnek, amiért egy igazán remek és összetartó csapat része lehettem.

Kollégáim közül külön is szeretném megköszönni a rengeteg szakmai segítséget és baráti támogatást Homa Mónikának, Dr. Nyilasi Ildikónak és Dr. Csernetics Árpádnak.

Köszönettel tartozom Dr. Kredics Lászlónak és Dr. Palanisamy Manikandannak, amiért lehetővé tették számomra, hogy egy hónapot tölthessek Coimbatore-ban, Indiában, az Aravind Eye Hospital and Postgraduate Institute of Ophthalmology mikrobiológiai laboratóriumában.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Szekeres Andrásnak, Bencsik Ottónak és Kecskeméti Anitának a HPLC vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Beátának és György Andreának a mikroszatellit-analízis kiértékelésében nyújtott segítségükért, valamint Dr. Varga Mónikának a HPLC vizsgálatok során nyújtott segítségéért.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a sok technikai segítségért; Dr. Palágyi Andrásnénak, Szőnyi Jánosnénak és Lengyel Boglárkának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért; valamint a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségükért és a kellemes munkahelyi légkörért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm páromnak, Lőz Attilának, amiért mindvégig mellettem állt és mindenben támogatott. Külön hálával tartozom szüleimnek és testvéreimnek, illetve családom minden tagjának, akik életem során szeretettel bíztattak és támogattak, hogy tanulmányaimat az általam választott területen folytassam.

11. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet. A különböző vizsgálatok során alkalmazott *Aspergillus* izolátumok.

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 3124	1122/10	Klinikai izolátum India 1/India klinikai 1	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1 és 2	+	+
SZMC 3125	1257/10	Klinikai izolátum India 2/India klinikai 2	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	+
SZMC 3050	802/10	Klinikai izolátum India 3/India klinikai 3	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	+
SZMC 3052	775/10	Klinikai izolátum India 4/India klinikai 4	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 3059	883/10	Klinikai izolátum India 5/India klinikai 5	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	+
SZMC 3062	656/10	Klinikai izolátum India 6/India klinikai 6	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	+
SZMC 3063	40/11	Klinikai izolátum India 7/India klinikai 7	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	+
SZMC 3066	177/11	Klinikai izolátum India 8/India klinikai 8	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	+	+
SZMC 3068	929/10	Klinikai izolátum India 9/India klinikai 9	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	+
SZMC 3069	875/10	Klinikai izolátum India 10/India klinikai 10	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1 és 2	-	+
SZMC 3070	67/11	Klinikai izolátum India 11/India klinikai 11	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 3071	1022/10	Klinikai izolátum India 12/India klinikai 12	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	+
SZMC 3086	243/11	Klinikai izolátum India 13/India klinikai 13	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	+
SZMC 3087	811/10	Klinikai izolátum India 14/India klinikai 14	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 3089	816/10	Klinikai izolátum India 15/India klinikai 15	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	+
SZMC 3051	1303/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	+	-

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 3053	702/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3054	792/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 3055	763/10	-	<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	-	+	-
SZMC 3056	711/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3057	14/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	-
SZMC 3058	34/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3060	343/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3061	23/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	+	-
SZMC 3064	1065/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3065	1023/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	-
SZMC 3067	28/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3072	1084/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3073	864/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3074	1333/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	-
SZMC 3075	1149/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	+	-
SZMC 3076	457/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	-
SZMC 3078	800/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	+	-
SZMC 3079	1076/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3080	856/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	+	-
SZMC 3081	1251/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	+	-

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 3082	1083/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	+	-
SZMC 3083	1224/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3084	1382/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	+	-
SZMC 3085	694/10	-	<i>Aspergillus tamarii</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	NT	-	+	-
SZMC 3088	382/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	-	-
SZMC 3090	881/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3092	1060/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 3093	889/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3094	839/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3095	309/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3096	613/10	-	<i>Aspergillus tamarii</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	NT	-	+	-
SZMC 3097	670/10	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 3098	653/10	-	<i>Aspergillus tamarii</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	NT	-	+	-
SZMC 3099	101/11	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 3077	693/10	<i>Aspergillus tamarii</i> SZMC 3077	<i>Aspergillus tamarii</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	NT	-	+	+
SZMC 22561	1500/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	-	-
SZMC 22562	1264/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22563	27/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22564	500/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22565	1475/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	-
SZMC 22566	1157/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	-

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 22567	279/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22568	632/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22569	778/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	-
SZMC 22570	709/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22571	1327/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22572	1193/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	-
SZMC 22573	234/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	2	-	-
SZMC 22574	855/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22575	721/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22576	1088/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1 és 2	-	-
SZMC 22577	781/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22578	177/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22579	1308/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22580	755/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22581	432/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	2	-	-
SZMC 22582	68/13	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22583	1199/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22584	1020/12	-	<i>Aspergillus flavus</i>	szaruhártya fertőzés	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 3040	25385/2010	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3042	35820/2010	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3045	100125	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 3046	59887/2010	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3047	57939/2010	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3048	44708/2010	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 23411	92130/2015	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 23412	90888/2015	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 23413	87775/2013	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 23414	92528/2013	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 23415	24565/2014	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 23416	70789/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 23417	68977/2014	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 23418	5242/2014	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	+	2	-	-
SZMC 23420	97641/2/2015	-	<i>Aspergillus flavus</i>	klinikai izolátum	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 22426	I. cotton 1	Környezeti izolátum India 1/India környezeti 1	<i>Aspergillus flavus</i>	gyapot	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22427	I. cotton 2	Környezeti izolátum India 2/India környezeti 2	<i>Aspergillus flavus</i>	gyapot	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22428	I. cotton 3	Környezeti izolátum India 3/India környezeti 3	<i>Aspergillus flavus</i>	gyapot	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22429	I. cotton 4	Környezeti izolátum India 4/India környezeti 4	<i>Aspergillus flavus</i>	gyapot	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22433	I. cotton 8	Környezeti izolátum India 5/India környezeti 5	<i>Aspergillus flavus</i>	kókusz	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22434	I. coconut 2A	Környezeti izolátum India 6/India környezeti 6	<i>Aspergillus flavus</i>	kókusz	Dél-India	-	2	-	+
SZMC 22436	I. coconut 1	Környezeti izolátum India 7/India környezeti 7	<i>Aspergillus flavus</i>	kókusz	Dél-India	-	1 és 2	-	+
SZMC 22437	I. coconut 2	Környezeti izolátum India 8/India környezeti 8	<i>Aspergillus flavus</i>	kókusz	Dél-India	-	1	-	+

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Szármaszási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 22438	I. coconut 3	Környezeti izolátum India 9/India környezeti 9	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	kókusz	Dél-India	+	-	-	+
SZMC 22442	I. coconut 7	Környezeti izolátum India 10/India környezeti 10	<i>Aspergillus flavus</i>	kókusz	Dél-India	-	1	-	
SZMC 22445	I. Acacia 1	Környezeti izolátum India 11/India környezeti 11	<i>Aspergillus flavus</i>	akácia	Dél-India	+	2	-	+
SZMC 22446	I. Acacia 2	Környezeti izolátum India 12/India környezeti 12	<i>Aspergillus flavus</i>	akácia	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22447	I. Acacia 3	Környezeti izolátum India 13/India környezeti 13	<i>Aspergillus flavus</i>	akácia	Dél-India	+	1	-	+
SZMC 22457	I. Seeds R1/1	Környezeti izolátum India 14/India környezeti 14	<i>Aspergillus flavus</i>	magvak	Dél-India	-	2	-	+
SZMC 22469	I. Soil C3/2	Környezeti izolátum India 15/India környezeti 15	<i>Aspergillus flavus</i>	talaj	Dél-India	+	2	-	+
SZMC 22430	I. cotton 5	-	<i>Aspergillus flavus</i>	gyapot	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22442	I. coconut 7	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kókusz	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22448	I. Acacia 4	-	<i>Aspergillus flavus</i>	akácia	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22449	I. Acacia 5	-	<i>Aspergillus flavus</i>	akácia	Dél-India	+	1	-	-
SZMC 22451	Soil V/1	-	<i>Aspergillus flavus</i>	talaj	Dél-India	-	1	-	-
SZMC 22458	I. Seeds R2/1	-	<i>Aspergillus flavus</i>	magvak	Dél-India	-	1 és 2	-	-
SZMC 22459	I. Seeds R2/2	-	<i>Aspergillus flavus</i>	magvak	Dél-India	-	2	-	-
SZMC 22460	I. Seeds R3/1	-	<i>Aspergillus flavus</i>	magvak	Dél-India	-	1 és 2	-	-
SZMC 21408	K 1/2012	Kukorica izolátum Szerbia 1/Kukorica 1	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21409	K 2/2012	Kukorica izolátum Szerbia 2/Kukorica 2	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 21410	K 3/2012	Kukorica izolátum Szerbia 3/Kukorica 3	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21411	K 4/2012	Kukorica izolátum Szerbia 4/Kukorica 4	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21412	K 5/2012	Kukorica izolátum Szerbia 5/Kukorica 5	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21413	K 6/2012	Kukorica izolátum Szerbia 6/Kukorica 6	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21414	K 7/2012	Kukorica izolátum Szerbia 7/Kukorica 7	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	2	-	+
SZMC 21415	K 8/2012	Kukorica izolátum Szerbia 8/Kukorica 8	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21416	K 9/2012	Kukorica izolátum Szerbia 9/Kukorica 9	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21417	K 10/2012	Kukorica izolátum Szerbia 10/Kukorica 10	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21418	K 11/2012	Kukorica izolátum Szerbia 11/Kukorica 11	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21419	K 12/2012	Kukorica izolátum Szerbia 12/Kukorica 12	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21420	K 13/2012	Kukorica izolátum Szerbia 13/Kukorica 13	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21421	K 14/2012	Kukorica izolátum Szerbia 14/Kukorica 14	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21422	K 15/2012	Kukorica izolátum Szerbia 15/Kukorica 15	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	+
SZMC 21423	K 16/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21424	K 17/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21425	K 18/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21426	K 19/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21427	K 20/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21428	K 21/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21429	K 22/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21430	K 23/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 21431	K 24/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 21432	K 25/2012	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Szerbia	-	1	-	-
SZMC 3014	A1/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3015B	A2/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3016B	A3/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3017B	A4/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3018B	A5/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3019B	A6/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3020B	A7/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3021B	A8/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3022B	A9/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3023B	A10/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3024B	A11/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3025B	A12/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3026B	A13/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3027B	A14/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3028B	A15/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3029B	A16/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3030B	A17/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 3031B	A18/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3032B	A19/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 3033B	A20/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 3034B	A21/2011	-	<i>Aspergillus flavus</i>	búza	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20743	Zt 27	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20744	Zt 31	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20745	Zt 34	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	+	1	-	-
SZMC 20746	Zt 41	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20747	Zt 55	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 20748	Zt 64	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20749	Zt 66	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20750	Zt 67	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 20751	Zt 69	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20752	Zt 80	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 20753	Zt 88	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20754	Zt 92	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	1	-	-
SZMC 20755	Zt 105	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	+	1	-	-
SZMC 20756	Zt 115	-	<i>Aspergillus flavus</i>	kukorica	Magyarország	-	2	-	-
SZMC 22369	10995B VII	Beltéri izolátum Horvátország 1/Indoor 1	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1	-	+
SZMC 22368	10995A VII	Beltéri izolátum Horvátország 2/Indoor 2	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	2	-	+
SZMC 22365	10989A VII	Beltéri izolátum Horvátország 3/Indoor 3	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	2	-	+
SZMC 22367	10993B VII	Beltéri izolátum Horvátország 4/Indoor 4	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1 és 2	-	+
SZMC 22372	11012B VII	Beltéri izolátum Horvátország 5/Indoor 5	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1	-	+

Szeged Mikrobiológiai Törzs- gyűjtemény (SZMC) azonosító	Izolátum azonosító	A genetikai variabilitás vizsgálata során készített törzsfákon szereplő elnevezések	Fajnév	Forrás	Származási hely	Elvégzett kísérletek			
						Aflatoxin- termelő képesség ^a	Párosodási típus gének vizsgálata (MAT) és a hordozott allél	Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata ^b	Genetikai variabilitás vizsgálata ^b
SZMC 22376	11112A XI	Beltéri izolátum Horvátország 6/Indoor 6	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1	-	+
SZMC 22377	11118A XI	Beltéri izolátum Horvátország 7/Indoor 7	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	2	-	+
SZMC 22380	11146B XI	Beltéri izolátum Horvátország 8/Indoor 8	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1 és 2	-	+
SZMC 22379	11119B XI	Beltéri izolátum Horvátország 9/Indoor 9	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1	-	+
SZMC 22378	11119A1 XI	Beltéri izolátum Horvátország 10/Indoor 10	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Horvátország	-	1	-	+
SZMC 21391	2010 nyár 2	Beltéri izolátum Magyarország 11/Indoor 11	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Magyarország	-	2	-	+
SZMC 21392	2010 nyár 3	Beltéri izolátum Magyarország 12/Indoor 12	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Magyarország	-	2	-	+
SZMC 21377	2009 ősz 3sz	Beltéri izolátum Magyarország 13/Indoor 13	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Magyarország	-	2	-	+
SZMC 2712	2009 nyár 12	Beltéri izolátum Magyarország 14/Indoor 14	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Magyarország	-	1	-	+
SZMC 2713	2009 nyár 13	Beltéri izolátum Magyarország 15/Indoor 15	<i>Aspergillus flavus</i>	beltéri levegő	Magyarország	-	1 és 2	-	+
SZMC 22631	III/4/2	-	<i>Aspergillus nomius</i>	sajt	Magyarország	+	-	-	-
SZMC 22273	NS 640 B/22	-	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	kukorica	Szerbia	+	-	-	-
SZMC 22727	10887 III	-	<i>Aspergillus parasiticus</i>	beltéri levegő	Horvátország	+	-	-	-
SZMC 22728	11062B IX	-	<i>Aspergillus parasiticus</i>	beltéri levegő	Horvátország	+	-	-	-

^a + és – jelek az egyes izolátumok aflatoxin-termelő képességét jelölik; +: termel, -: nem termel, NT: nem aflatoxin-termelő faj.

^b + és – jelek az elvégzett kísérletre utal; +: az adott kísérletet elvégeztük az adott izolátum esetében, -: az adott kísérletet nem végeztük el az adott izolátum esetén.